



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS: POTENCIAL DE
UTILIZAÇÃO EM MEDICINA DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
Inês Rocha Antunes
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2020



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS: POTENCIAL DE
UTILIZAÇÃO EM MEDICINA DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
Inês Rocha Antunes
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Francisco João Salvado e Silva

setembro de 2020

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer ao meu orientador, o Prof. Doutor Francisco João Salvado e Silva, pelo acompanhamento durante a realização desta dissertação. O conhecimento e entusiasmo que exprimia durante as suas aulas motivaram a escolha deste tema.

Agradeço também à minha querida amiga Ana Sofia, quem eu conheci por acaso no meio destes cinco anos de curso, mas que se veio a tornar uma grande amizade para mim. Desde cedo que soube que poderei contar com ela para qualquer coisa, pois estará sempre disponível com o seu sorriso.

A todos os meus amigos de curso, realçando a minha parceira de clínica Sofia, que apesar de nos termos separado por consequências fora do nosso alcance, nunca irei esquecer o seu apoio e todas as conversas e aventuras. Às minhas queridas gémeas, Sofia e Filipa, conhecemo-nos no primeiro dia de faculdade e nunca mais nos largámos, desde boleias, a dúvidas de exames, até lanchinhos e festas, foram também das amigas mais chegadas.

À minha irmã gémea Carolina, estando ambas a escrever uma tese ao mesmo tempo, foi isso que nos deu força e motivação uma a outra para continuar e insistir nos momentos de pior inspiração.

Aos meus pais que tanto adoro, e me ajudaram muito nesta conquista e desafio. São eles as pessoas que eu mais admiro, tanto a nível profissional, como a nível social e familiar. Espero um dia conseguir alcançar tanto quanto alcançaram e ter um desempenho na vida correspondente.

À minha avó Bibi, tão paciente e carinhosa, sempre preocupada com o meu futuro, e que nesta reta final tanto insistiu para que eu conseguisse atingir todos os meus objetivos, sem que nada se intrometesse.

Quero finalmente agradecer ao meu namorado Duarte, sem ele eu não sei como teriam sido estes anos de curso, mas sem dúvida que teriam sido mais solitários. Devo-lhe toda a paciência e persistência que foram indispensáveis para o culminar do curso. O meu maior apoio, que eu amo do fundo do coração.

Resumo

A população das células estaminais já é estudada há vários anos como recurso de células com propriedades regenerativas. Mais especificamente as células estaminais mesenquimais têm sido o principal foco de estudo atualmente, pois não implicam tantos problemas éticos como as células estaminais embrionárias.

Existem diversas fontes de recolha de células estaminais mesenquimais, sendo as mais usadas a medula óssea e o tecido adiposo. Algumas dessas fontes são também os tecidos dentários e orais (DMSCs), como os dentes decíduos exfoliados, de onde se recolhem as SHEDs, o ligamento periodontal, onde se encontram as PDLSCs, a papila apical, recolhem-se as SCAPs, os folículos dentários, as suas MSCs são as DFSCs e o gérmen dentário, que contém as TGSCs.

Depois da recolha dessas células, várias são as aplicações para as quais se podem utilizar, dentro da medicina regenerativa. E na medicina dentária, o potencial de regeneração é um fator de extrema importância, para os vários defeitos que podem ocorrer. São eles: defeitos do tecido duro dentário, como doenças pulpares ou periodontais; defeitos maxilofaciais e defeitos da mucosa.

As DMSCs têm sido cada vez mais estudadas e abordadas na engenharia de tecidos, devido às suas propriedades de regeneração acopladas à sua facilidade de recolha.

Com esta revisão bibliográfica serão abordadas as várias propriedades, funções, fontes e aplicações das MSCs e das DMSCs, apoiadas pela literatura mais recente, bem como o futuro da sua investigação e utilização.

Palavras-chave: Células Estaminais Mesenquimais, Regeneração Tecidual, Regeneração Óssea, Regeneração Dentária

Abstract

The stem cell population has been studied for many years as a resource of cells with regenerative properties. Specifically, mesenchymal stem cells have been the main focus of study these days, as they do not entail as many ethical issues as embryonic stem cells.

There is varied number of collection sources of mesenchymal stem cells, however the bone marrow and the adipose tissue are the most used. Other sources include the oral and dental tissues (DMSCs), such as exfoliated teeth, from where SHEDs are collected, the periodontal ligament, where one can find the PDLSCs, the apical papilla, from where SCAPs are harvested, the dental follicle, its MSCs are the DFSCs and the dental germs, that contains the TGSCs.

After those cells are collected, there are various possible applications in the regenerative medicine field; and in dentistry the regenerative potential is an aspect of great importance for all the defects that happen in the oral cavity. Hard dental tissue defects, pulp and periodontal diseases, maxillofacial defects and mucosal defects.

The DMSCs are being more and more studied and addressed in tissue engineering, due to their regenerative properties, coupled with their ease in harvesting.

With this literature review, there will be approached the properties, functions, sources and applications of the MSCs and the DMSCs, supported by the latest literature, as well as its investigation and uses in the future.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Tissue Regeneration, Bone Regeneration, Dental Regeneration

Índice

I.	Introdução	11
II.	Desenvolvimento	13
2.1	Introdução Histórica	13
2.2	Células Estaminais- Definição	15
2.2.1	Células Estaminais- Paradigma	16
2.3	Células Estaminais- Tipos.....	17
2.4	Células Estaminais Mesenquimais- Definição	18
2.5	Células Estaminais Mesenquimais- Fontes	20
2.5.1	Medula Óssea- BMMSCs.....	20
2.5.2	Tecido Adiposo- ATMSCs.....	21
2.5.3	Tecidos Dentários- DMSCs.....	22
b)	SHEDs	25
c)	PDLSCs	25
d)	SCAPs.....	27
e)	DFSCs.....	27
f)	TGSCs	28
2.6	Aplicações das Células Estaminais Mesenquimais na Medicina Dentária	29
2.6.1	Regeneração da polpa dentária	30
2.6.2	Regeneração do ligamento periodontal	33
2.6.3	Regeneração dos tecidos maxilofaciais	35
2.7	Células MUSE	38
2.8	Banco de células estaminais dentárias	40
2.9	Futuro na utilização das células estaminais mesenquimais na medicina dentária	42
III.	Conclusão	45
IV.	Bibliografia.....	47

Índice de Figuras

Figura 1: As células estaminais derivam da massa celular interna do blastocisto	15
Figura 2: O Paradigma das células estaminais.	17
Figura 3: A multipotencialidade das MSCs.	19
Figura 4: Aspição e biópsia da medula óssea.	21
Figura 5: Desenho esquemático ilustrando as diversas fontes das células estaminais mesenquimais derivadas dos tecidos dentários.	23
Figura 6: Defeitos dos tecidos orais e maxilofaciais.	29
Figura 7: Representação da técnica <i>homing</i> celular para regeneração pulpar....	32
Figura 8: Esquema do transplante celular utilizando a tecnologia de cell transfer.	35
Figura 9: Possíveis aplicações das células estaminais na regeneração de tecidos maxilofaciais.	36
Figura 10: Demonstração da implantação de scaffolds com MSCs e fatores de crescimento num defeito alveolar mandibular.	37
Figura 11: Diagrama esquemático que mostra as diferenças básicas entre as células MUSE e as células não MUSE.	40
Figura 12: Processo standard esquematizado da criopreservação e manufatura dos produtos baseados em células estaminais dentárias.	41

Índice de Tabelas

Tabela 1: Critérios para a definição de Célula Estaminal Mesenquimal	
Multipotente.....	14
Tabela 2: Fontes e potencial de diferenciação das células estaminais para	
terapias regenerativas.....	18

Lista de abreviaturas

ATMSCs: do Inglês *Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais do Tecido Adiposo)

ABSCs: do Inglês *Alveolar Bone Stem Cells* (Células Estaminais do Osso Alveolar)

BMMSCs: do Inglês *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais da Medula Óssea)

CNS-SC: do Inglês *Central Nervous System Stem Cells* (Células Estaminais do Sistema Nervoso Central)

DP-MSCs: do Inglês *Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais da Polpa Dentária)

DFSCs: do Inglês *Dental Follicle Stem Cells* (Células Estaminais do Folículo Dentário)

ESCs: do Inglês *Embryonic Stem Cells* (Células Estaminais Embrionárias)

GMSCs: do Inglês *Gingival Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais da Gengiva Aderida)

HSCs: do Inglês *Hematopoietic Stem Cells* (Células Estaminais Hematopoéticas)

iPSCs: do Inglês *Induced Pluripotent Stem Cells* (Células Estaminais Pluripotentes Induzidas)

ISCT: do Inglês *International Society for Cellular Therapy* (Sociedade Internacional de Terapia Celular)

MSCs: do Inglês *Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais)

OESCs: do Inglês *Oral Epithelium Stem Cells* (Células Estaminais do Epitélio Oral)

PDL: do Inglês *Periodontal Ligament* (Ligamento Periodontal)

PDLSCs: do Inglês *Periodontal Ligament Stem Cells* (Células Estaminais do Ligamento Periodontal)

SCAPs: do Inglês *Stem Cells From Apical Papilla* (Células Estaminais da Papila Apical)

SHEDs: do Inglês *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth* (Células Estaminais de Dentes Decíduos Exfoliados)

TGSCs: do Inglês *Tooth Germ Stem Cells* (Células Estaminais do Gérmen Dentário)

I. Introdução

A reparação e regeneração dos tecidos craniofaciais representam um desafio para os clínicos. Poderão ser requeridas nas mais diversas situações, como por exemplo em casos de tumores, traumas ou malformações congénitas. (Ansari et al., 2017) Uma das razões para a complexidade do desafio, prende-se com o facto de a região craniofacial ser complexa na sua estrutura, sendo constituída por osso, cartilagem, tecidos moles e feixes neuro-vasculares. (Ansari et al., 2017) A investigação e estudo deste tema caminha no sentido de analisar as várias abordagens para a regeneração dos tecidos craniofaciais, em que se maximizem os benefícios para o doente, e se minimizem as complicações que poderão estar relacionadas. (Ansari et al., 2017)

O campo que se dedica ao desenvolvimento de substitutos funcionais para o tecido lesado, aplicando os princípios da biologia e engenharia, é a engenharia biomédica de tecidos. (Langer & Vacanti, 1993) Segundo Langer e Vacanti (1993), está incluída num “campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e da ciência no desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função de um tecido ou de um órgão”. Pode ser ainda definida como “um método para compreender os princípios de crescimento de tecidos, e aplicar esse conceito para produzir um tecido de substituição para fins clínicos”. (Peng et al., 2009)

A engenharia biomédica de tecidos foi introduzida nos anos 90, e baseia-se na conjugação dos três componentes major dos tecidos: as células, a sua matriz extracelular, e um sistema de sinalização (Bossù et al., 2014)

As células estaminais, por definição, são células clonogénicas, relativamente indiferenciadas, com a capacidade de autorrenovação, e de diferenciação em diferentes linhagens. (Han et al., 2014) Estas células possuem inúmeras aplicações na área da medicina (Samsonraj et al., 2017), dado que um dos principais objetivos da investigação científica no campo da medicina é fornecer técnicas e materiais que auxiliem na reparação de tecidos danificados ou perdidos. (Bossù et al., 2014) Dietmar Mieth afirma, “the term stem cells has become the magic password for entering a medical utopia where physicians will be able to overcome all human ailments once and for all” (Carvalho, 2010). Estas células podem ter três origens principais: células estaminais embrionárias (ECSs), células estaminais adultas ou mesenquimais (MSCs) e células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs). (Bossù et al., 2014)

Mais precisamente, as células estaminais mesenquimais (MSCs) são consideradas candidatos adequados para a engenharia de tecidos, devido ao seu elevado rácio de expansão e ao seu potencial de diferenciação em células de diversos órgãos e sistemas. (Han et al., 2014) Para além disso, não foram associadas a nenhum caso de formação espontânea de tumores *in vivo*, nem estão dependentes de quaisquer considerações éticas, ao contrário do que pode acontecer com as células estaminais embrionárias. (Han et al., 2014) Adicionalmente, as MSCs parecem ter características hipo-imunogénicas, as quais as torna convenientes para transplantes alogénicos, e ainda exibirem propriedades imunossupressoras sobre o transplante. (Han et al., 2014)

II. Desenvolvimento

2.1 Introdução Histórica

O conceito de células estaminais surgiu no final do século XIX, e este definia teoricamente a habilidade de certos tecidos, como o sangue, ou a pele, de se autorrenovarem indefinidamente durante a vida de um organismo, apesar de serem compostos por células com um ciclo de vida curto. (Bianco et al., 2008)

A primeira população de células estaminais foi identificada na medula óssea de ratos adultos, por McCulloch e Till, no ano de 1960. (Marcus & Woodbury, 2008). As investigações nestas colônias, mais tarde denominadas células estaminais hematopoéticas (HSCs), puderam estabelecer as duas propriedades funcionais de uma população de células estaminais: autorrenovação e multipotência. (Marcus & Woodbury, 2008) Tal como Marcus & Woodbury (2008) apontaram, estes estudos foram tomados como ponto de referência para a base da biologia das células estaminais, revolucionando a forma como os médicos e cientistas tratam e estudam as doenças.

As células estaminais mesenquimais (MSCs) foram pela primeira vez descritas em 1976 por Friedenstein como células clonogénicas, derivadas da medula óssea, e com propriedades de aderência ao plástico. (Han et al., 2014). Estas foram isoladas da medula óssea e estroma do baço e timo de ratos adultos, tendo sido inicialmente intituladas de células estaminais da medula óssea e estroma (BMSCs). (Han et al., 2014) Os autores Friedenstein & Owen demonstraram ainda que essas células eram identificadas pela sua capacidade de formar colônias clonais em culturas de amostras de medula óssea. (Han et al., 2014)

Após estas marcantes descobertas, surge um conceito para as complementar: nicho da célula estaminal. (Papayannopoulou & Scadden, 2008) Foi proposto em 1978 por Schofield e sugere que a célula estaminal hematopoética é regulada pela sua associação física com um microambiente celular específico no interior da medula óssea, denominado de nicho. (Bianco et al., 2008) Este conceito manteve-se uma hipótese até ter sido validado empiricamente em 1998 por Xie e Spradling. Os cientistas usaram a *drosophila melanogaster*, ou mosca da fruta, para provar que a célula estaminal reside numa localização altamente especializada, que controla a sua diferenciação. (Papayannopoulou & Scadden, 2008)

No entanto, foi apenas em 1998 que uma equipa de cientistas da Universidade de Wisconsin-Madison, liderada por James Thompson, se tornaram os primeiros a isolar células estaminais embrionárias humanas em laboratório. (Santosh & Bose, 2019) Usaram embriões humanos produzidos com o propósito de investigação clínica, por fertilização *in vitro*, isolados e implantados em fibroblastos embrionários irradiados de ratos. (Mora et al., 2017) Apesar de terem contribuído muito para a investigação acerca das células estaminais pluripotentes, este procedimento implicou a destruição de embriões humanos, o que causou controvérsia relativamente à ética e moralidade. (Mora et al., 2017)

Anos mais tarde, a Sociedade Internacional da Terapia Celular (ISCT) propôs o termo “Célula Estaminal Mesenquimal” e a sigla “MSC”, do inglês Mesenchymal Stem Cell. E estabeleceram três critérios, que todas as células estaminais mesenquimais tinham de possuir, tal como descrito na Tabela 1. (Han et al., 2014)

Critérios para a definição de Célula Estaminal Mesenquimal Multipotente	
Aderência ao plástico	Em culturas em situações standard
Padrão específico de expressão de antígeno (Ag) de superfície	Pelo menos 95% da população de MSC deve expressar os marcadores CD105, CD73 e CD90. E menos de 2% da população deve expressar os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 e HLA-DR
Potencial de diferenciação multipotente	As populações de MSC devem dar origem a pelo menos três tipos de linhagens celulares: osteogénicas, condrogénicas e adipogénicas, sob condições standard de diferenciação <i>in vitro</i>

Tabela 1: Critérios para a definição de Célula Estaminal Mesenquimal Multipotente. Adaptado de (Dominici et al., 2006)

Em 2018 foi autorizada a venda do primeiro produto com células estaminais mesenquimais, pela Agência Europeia de Medicamentos, destinado ao tratamento de fístulas perianais complexas em pacientes com a doença de Crohn. (Rendra et al., 2020)

Devido a estas propriedades, mas também devido a resultados encontrados em trabalhos experimentais, as MSCs parecem ser uma ferramenta essencial e promissora para a engenharia de tecidos e terapia celular. (Trohatou & Roubelakis, 2017)

Dentro da medicina dentária especificamente, não há dúvida que a engenharia de tecidos oferece esperança para os pacientes que sofram de perda dentária, perda óssea, entre outros. (Peng et al., 2009)

2.2 Células Estaminais- Definição

O corpo humano aloja mais de 200 tipos de células diferentes, e todos estes tipos provêm de um conjunto de células estaminais do embrião, mais precisamente da massa celular interna do blastocisto, como representado na figura 1. (Santosh & Bose, 2019)

A célula estaminal, segundo a definição encontrada no glossário para biologia de células estaminais (Smith, 2006) é uma célula que tem a capacidade de produzir continuamente células-filhas inalteradas, mas também células-filhas com propriedades diferentes e restritas. Conforme constata Weissman (2000), as células estaminais são unidades de organização biológica, responsáveis pelo desenvolvimento e regeneração de tecido e sistemas de órgão, que estão em constante evolução pela seleção natural. São células clonogênicas, capazes de autorrenovação e diferenciação em diferentes linhagens. (Han et al., 2014)

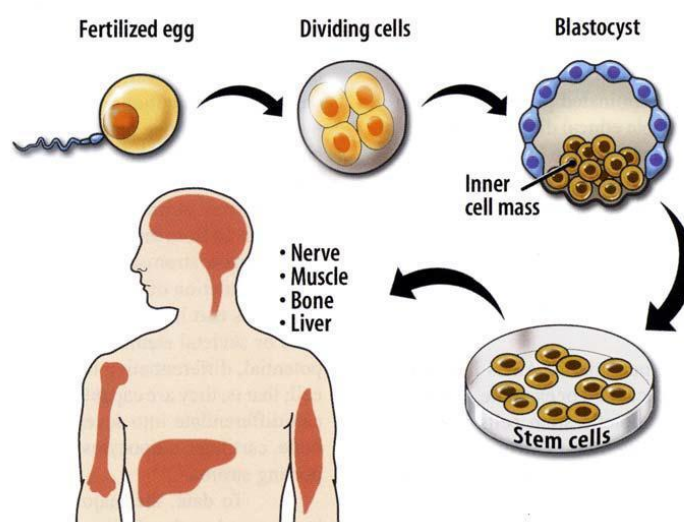


Figura 1: As células estaminais derivam da massa celular interna do blastocisto. Adaptado de (Krebsbach & Robey, 2002)

Em relação à diferenciação celular, existem 3 processos principais: 1. Interação célula-célula; 2. divisão celular e 3. regulação gênica. (Bydlowski et al., 2009)

1. Na primeira, as células vizinhas secretam substâncias específicas que criam um ambiente propício para a diferenciação;

2. A segunda pode ser simétrica, originando duas células-filha iguais entre si e a iguais à célula-mãe, sendo que nestes casos não ocorre diferenciação, ou assimétrica,

originando duas células-filha diferentes uma da outra, podendo ser iguais ou diferentes da célula mãe, participando na diferenciação tecidual;

3. Por fim, os dois fatores principais que envolvem a regulação génica são acetilação da cromatina, que é responsável pela diferença entre heterocromatina; e a metilação de determinadas sequências genéticas, como por exemplo as regiões promotoras que fazem com que o gene regulado não seja expresso quando essa zona se encontra metilada.

(Bydlowski et al., 2009, p.30)

2.2.1 Células Estaminais- Paradigma

O paradigma das células estaminais baseia-se nas suas propriedades de auto-renovação e pluri/multipotencialidade: a primeira faz com que a contagem de células indiferenciadas se mantenha ao longo da vida; a segunda garante a sua diferenciação em vários tipos celulares. (Argentati et al., 2018) Ambas as características acontecem nos vários tipos de células estaminais

A auto-renovação e a pluri/multipotencialidade são propriedades que advêm do mecanismo particular de divisão celular, denominado de divisão assimétrica, já referido anteriormente, representado na figura 2, do qual resultam duas células-filha, em que uma mantém as mesmas características de multipotencialidade da célula mãe, e a outra desenvolve capacidades mais restritas de diferenciação, tornando-se tripotente ou bipotente. (Argentati et al., 2018; Bydlowski et al., 2009) É através do mecanismo de divisão assimétrica, em união também com o mecanismo de divisão simétrica, que o número de células estaminais se mantém equilibrado, entre células estaminais indiferenciadas e diferenciadas. (Argentati et al., 2018)

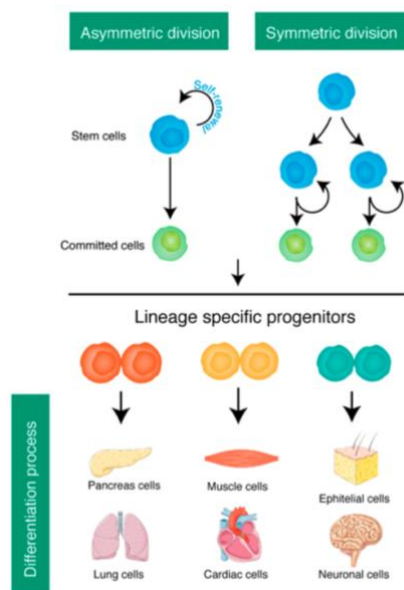


Figura 2: O Paradigma das células estaminais. Adaptado de (Argentati et al., 2018)

2.3 Células Estaminais- Tipos

Como indicado na tabela 2, as células estaminais normalmente podem ter 4 origens diferentes: tecido embrionário; tecido fetal, como o feto, a placenta, o líquido amniótico e o cordão umbilical; localizações específicas no organismo adulto, como gordura, medula óssea, músculo esquelético, pele ou sangue; e células somáticas diferenciadas depois de terem sido reprogramadas geneticamente, como as iPSCs. (Bacakova et al., 2018)

No que toca ao seu potencial de diferenciação, estas células são divididas em vários grupos. As células estaminais embrionárias da mórula são as únicas que possuem totipotência, sendo capazes de se diferenciar em todos os tipos de células do organismo, incluindo as células da placenta. As células estaminais embrionárias do blastocisto, (estado mais tardio do desenvolvimento embrionário) são pluripotentes, podendo criar qualquer tecido do corpo, exceto a placenta. Já as células derivadas diretamente do feto são usualmente multipotentes, pois apenas se diferenciam num número limitado de tipos especializados de células. As células estaminais adultas são multipotentes, no entanto também são encontradas algumas células que expressam marcadores de pluripotência, e ainda outros conjuntos que são oligopotentes, bipotentes ou ainda unipotentes. (Bacakova et al., 2018)

Células Estaminais	Fonte	Potencial de diferenciação
Embrionária	Mórula	Totipotentes
	Blastocisto	Pluripotentes
	Feto e Tecidos extra-fetais (placenta, líquido amniótico, cordão umbilical)	Multipotentes, pluripotentes
Adulta	BMMSCs Outros tecidos e órgãos (tecido adiposo, pele, músculo esquelético, coração, fígado, sangue, etc)	Multipotentes, pluripotentes Multipotentes, oligopotentes, bipotentes e unipotentes
Induzida	Células somáticas diferenciadas	Pluripotentes

Tabela 2: Fontes e potencial de diferenciação das células estaminais para terapias regenerativas. Adaptado de (Bacakova et al., 2018)

2.4 Células Estaminais Mesenquimais- Definição

Originalmente o termo “mesenquimal” era usado para descrever o tecido conjuntivo laxo do embrião em desenvolvimento, cujo dá origem às células do tecido conjuntivo adulto. (Trohatou & Roubelakis, 2017)

As células estaminais mesenquimais, que também podem ser chamadas de células estromais mesenquimais multipotentes, pertencem a um grupo heterogêneo de células que têm a capacidade de se proliferar *in vitro* como células aderentes ao plástico, têm uma morfologia tipo fibroblasto, formam colônias *in vitro*, e podem-se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos. (Uccelli et al., 2008) & (Trohatou & Roubelakis, 2017) Estes últimos representam uma população derivada da mesoderme, mas podem também diferenciar-se em células de origem endodérmica e ectodérmica, através do processo de transdiferenciação, como representado na figura 3. Este processo pressupõe a capacidade de uma célula não estaminal para se transformar numa célula de uma linhagem diferente, ou quando uma célula estaminal já parcialmente diferenciada se transforma numa célula de uma linhagem diferente. (Uccelli et al., 2008) Um exemplo seria uma célula estaminal do sistema nervoso central (CNS-SC) se transdiferenciar numa célula estaminal hematopoética (HSC). (Weissman, 2000)

A ectoderme, mesoderme, e endoderme são as três camadas germinais que constituem a origem de todos os tecidos e órgãos do corpo humano que se vão formar durante o desenvolvimento embrionário. (Ferretti & Hadjantonakis, 2019) As células de origem mesodérmica (camada do meio) são as mais abundantes, e representam uma grande variedade de células, incluindo as do sistema musculoesquelético (osso, cartilagem e músculo), do sistema cardiovascular (coração, sangue e vasos sanguíneos),

do sistema urogenital e ainda os tecidos conjuntivos. (Ferretti & Hadjantonakis, 2019) As células endodérmicas (camada interna) dão origem às células digestivas, pancreáticas e pulmonares e as ectodérmicas (camada externa) dão origem às células da pele e anexos (pelos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas) e às células do sistema nervoso. (Andreasen et al., 2007)

Para além disso, também tem sido defendido recentemente que estas células possuem uma forte capacidade anti-proliferativa e anti-inflamatória. (Uccelli et al., 2008)

No entanto é difícil fazer uma caracterização mais completa desta população tão heterogênea, devido à ausência de marcadores específicos que sejam expressados apenas pelas MSCs. (Trohatou & Roubelakis, 2017)

Como referido anteriormente, Friedenstein (1976), demonstrou que eram as células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea (BMMSCs) que davam origem à maior parte dos tecidos mesenquimais, (Uccelli et al., 2008) sendo a medula óssea considerada a melhor fonte de MSCs humanas até ao momento (Trohatou & Roubelakis, 2017) No entanto, o tecido adiposo começa também a ser considerado uma fonte importante de MSCs, principalmente após a autorização cedida pela Agência Europeia de Medicamentos em 2018, no contexto de medicamentos de terapia avançada (ATMP, em inglês *advanced therapy medicinal products*), mencionado anteriormente. (Rendra et al., 2020)

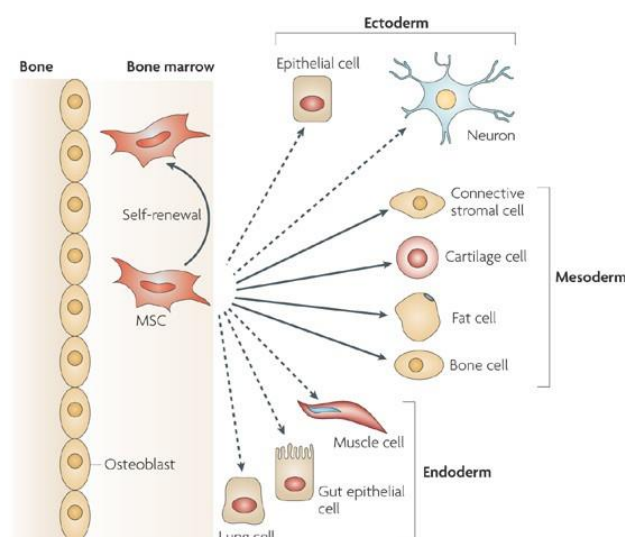


Figura 3: A multipotencialidade das MSCs: a sua autorrenovação e a sua múltipla diferenciação em linhagens pertencentes à mesoderme. E ainda a sua habilidade de se transdiferenciar em células de outras linhagens (ectoderme e endoderme). Adaptado de (Uccelli et al., 2008)

2.5 Células Estaminais Mesenquimais- Fontes

O microambiente em que as células estaminais mesenquimais residem é chamado de *nicho*, variando de acordo com o tecido de origem, e é responsável pela homeostasia das MSCs, pelo controlo da sua proliferação e pela manutenção das populações celulares. (Giai Via et al., 2012) Scadden (2006), definiu nicho como “uma localização anatómica específica que regula a participação da célula estaminal na geração, manutenção e reparação tecidual (...) Apenas a localização anatómica de uma célula estaminal não é suficiente para definir nicho. O nicho deve englobar ambas dimensões anatómicas e funcionais”.

Os vários componentes dos nichos ainda estão a ser estudados, para que as condições do nicho *in vivo* possam ser replicadas para *in vitro*. (Giai Via et al., 2012)

Tem sido reportado que tanto os tecidos adultos como os tecidos fetais podem servir de nicho para as MSCs. (Giai Via et al., 2012) Hoje em dia as principais fontes de MSCs são a medula óssea e o tecido adiposo, mas também outras estruturas estão a ser estudadas como possíveis fontes, como o osso trabecular e cortical, membranas sinoviais, tendões, músculo esquelético, sangue periférico, periósteo, sangue do cordão umbilical e geleia de Wharton, pele, sistema nervoso central, e ainda polpa e tecidos dentários. A utilização de fontes de tecidos alternativos surgiu porque o uso de BMMSCs em ensaios clínicos é limitado, estando relacionado com o facto da sua colheita ser invasiva. Dor, hemorragia e infeção são algumas das possíveis complicações resultantes da obtenção de BMMSCs. (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018; Giacoppo et al., 2017; Giai Via et al., 2012) Nos próximos pontos serão aprofundadas as duas principais origens de MSCs, a medula óssea e o tecido adiposo, e ainda a polpa e tecidos dentários.

2.5.1 Medula Óssea- BMMSCs

As células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea recebem a definição de células não-hematopoiéticas, multipotentes, que suportam a expansão de células hematopoiéticas *in vitro* e se conseguem diferenciar em múltiplas linhagens de células como adipócitos, condroblastos, osteoblastos e células miogénicas. (Giai Via et al., 2012) & (Giacoppo et al., 2017)

A região anatômica que mais se usa para a recolha de BMMSCs é a crista ilíaca, contudo esta está fortemente associada a morbilidade da região dadora, tendo sido reportada dor crónica em 39% dos casos. (Giai Via et al., 2012) O corpo vertebral tem sido outra região usada, pois possui uma concentração de células precursoras osteogénicas equiparável à da crista ilíaca. (Giai Via et al., 2012) A cabeça umeral também tem sido descrita na literatura como possível fonte de BMMSCs, sendo defendido por Mazzocca (2010) como um procedimento seguro e reproduzível, sem complicações intraoperatórias, pós-operatórias ou aumento da morbilidade para o paciente. (Giai Via et al., 2012)

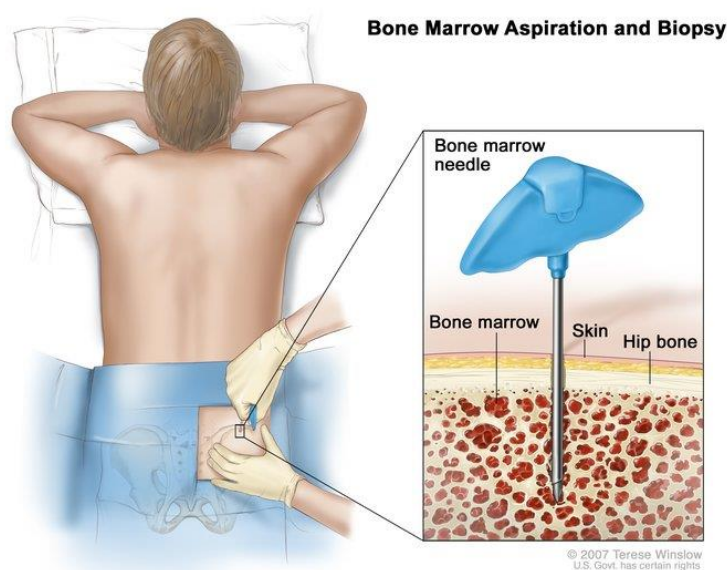


Figura 4: Aspiração e biópsia da medula óssea. For the National Cancer Institute © (2007) Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights

2.5.2 Tecido Adiposo- ATMSCs

O tecido adiposo é uma das fontes mais ricas de MSC; estas foram isoladas pela primeira vez por Zuk et al. em 2001. (Giai Via et al., 2012) Este local é considerado uma alternativa bem mais atrativa em comparação à medula óssea, devido à facilidade na colheita de tecido, dado que é relativamente abundante no corpo humano. (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018; Giai Via et al., 2012) Uma amostra aspirada pode conter à volta de 5000 cel/g de tecido adiposo, enquanto que na medula óssea não ultrapassa os 100-1000 cel/mL de medula. (Giacoppo et al., 2017) É estimado que aproximadamente 98% -100% das células obtidas do tecido adiposo são viáveis,

sendo que a sua morfologia, fenótipo e características funcionais são similares às BMSCs. (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018)

As ATMSCs podem ser obtidas por lipoaspiração, ou excisão de gordura, e ambos os procedimentos podem ser realizados sob anestesia local, se forem necessárias apenas pequenas quantidades de tecido adiposo. (Giai Via et al., 2012)

No entanto, este tipo de células acarreta uma desvantagem: as características do doador, como por exemplo a idade, influenciam a sua qualidade no que toca à expansão e diferenciação, especialmente em linhagens de células osteogénicas e condrogénicas. (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018)

2.5.3 Tecidos Dentários- DMSCs

As DMSCs dentárias são células derivadas da crista neural ectomesenquimal, estando localizadas na polpa de dentes decíduos e permanentes e no ligamento periodontal. (Sharpe, 2016)

As células estaminais mesenquimais derivadas da polpa dentária foram isoladas pela primeira vez da polpa dentária humana, por Grontos et al. (2000). (Giacoppo et al., 2017) A polpa dentária pode ser considerada similar à medula óssea em vários aspetos, sendo ambos tecidos altamente vascularizados e inervados, revestidos por tecido mineral; sendo que em ambas as MSCs são capazes de se diferenciar em células que originam tecido mineral. Na medula óssea essa função pertence aos osteoblastos, e na polpa aos odontoblastos. (Sharpe, 2016)

Cada população de células estaminais mesenquimais derivadas dos tecidos dentários recebe o seu nome de acordo com o seu tecido de origem, sendo as DPMSCs, derivadas da polpa dentária, as primeiras a serem estudadas e isoladas, como já foi referido. (Sharpe, 2016)

Subsequentemente foram isoladas também de dentes decíduos exfoliados - SHED, do ligamento periodontal- PDLSCs, do folículo dentário- DFSCs, do osso alveolar- ABSCs, do gérmen dentário- TGSCs e da papila apical- SCAPs. (Dave & Tomar, 2018; Junjun Liu et al., 2015) Estas localizações encontram-se representadas na figura 5. As células estaminais derivadas do ligamento periodontal especificamente, possuem a capacidade de formar estruturas como cimento, ligamento, fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, macrófagos, restos de malassez, e elementos vasculares. (Giacoppo et al., 2017) Também na mucosa oral são encontradas MSCs, as células

estaminais mesenquimais do epitélio oral (OESCs) e as células estaminais mesenquimais da gengiva aderida (GMSCs) (Dave & Tomar, 2018)

Dentro das DMSCs, as PDLSCs e as GMSCs possuem especial interesse, devido à sua facilidade de acesso dentro da cavidade oral, sendo que podem ser obtidas após cirurgias cujo material recolhido iria ser descartado. (Ansari et al., 2017)

As DMSCs são fáceis de criopreservar, e possuem propriedades de imunomodulação, tal como as ATMSCs. (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018) Possuem ainda a habilidade de se diferenciar em vários tipos de células, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, mioblastos, endoteliócitos, melanócitos e ainda células neurais. (Giacoppo et al., 2017) Sendo assim, podem ser aplicadas para a regeneração de tecido ósseo, de hepatócitos, neurogênese, angiogênese, regeneração oral, maxilofacial e craniofacial e muitos outros tecidos. (Dave & Tomar, 2018)

As MSCs derivadas dos tecidos dentários são células fusiformes grandes, com um núcleo central também grande, que desenvolvem extensões citoplasmáticas em cultura. Em termos morfológicos são muito semelhantes às células estaminais obtidas da medula óssea. (Rodríguez-Lozano et al., 2012)

Em comparação com as BMMSCs, as DPMSCs são mais fáceis de obter e acarretam menos problemas éticos e de risco para o paciente, pois a sua colheita é muito menos invasiva. (Giacoppo et al., 2017)

No entanto, estas células também apresentam certas limitações, como variabilidade na quantidade e qualidade das células obtidas. (Dave & Tomar, 2018)



Figura 5: Desenho esquemático ilustrando as diversas fontes das células estaminais mesenquimais derivadas dos tecidos dentários. Adaptado de (Junjun Liu et al., 2015)

a) DPMSCs

As DPSCs foram as primeiras células estaminais derivadas dos tecidos dentários a serem descobertas, como já foi referido. (Bossù et al., 2014) Possuem uma morfologia tipo fibroblasto, alongadas, fusiformes, com propriedades de plasticidade e aderência. (Dave & Tomar, 2018) Localizam-se anatomicamente num nicho perivascular do tecido pulpar, e possuem capacidade de autorenovação e diferenciação multipotente. (Bossù et al., 2014) Podem diferenciar-se em odontoblastos, adipócitos, células neurais, osteoblastos, condrócitos e células tipo mioblastos. (Bossù et al., 2014)

O seu poder de duplicação populacional é elevado, com a formação de novas colónias até 60 vezes, *in vitro*. (Dave & Tomar, 2018)

Gronthos et al. (2000) verificaram que DPSCs *ex vivo* expandidas formaram estruturas ectópicas tipo polpa-dentina em ratos imunodeficientes. (Huang et al., 2009) Batouli et al. (2003) verificaram que quando DPSCs são colocadas sob uma superfície de dentina e implantadas em ratos imunodeficientes, são depositadas estruturas tipo dentina reparadora sob a superfície da dentina. (Huang et al., 2009) A Graziano et al. (2008) provaram ainda a formação de tecido tipo osso pelas DPSCs, no entanto a sua aplicação para regeneração de defeitos periodontais é questionável, devido à sua limitada capacidade em formar cimento. (Bassir et al., 2016)

A criopreservação de DPSCs em nitrogénio líquido é ainda clinicamente possível para a sua utilização futura, fornecendo uma prospetiva vantajosa para o seu uso na medicina regenerativa. (Bossù et al., 2014) Este tópico será abordado posteriormente.

O potencial das DPSCs para armazenamento a longo prazo tem sido estudado, e Papaccio et al. (2006) descobriram que após 2 anos de armazenamento as células ainda eram capazes de se diferenciar em pré-osteoblastos e produzir tecidos ósseos, para além de ainda expressarem alguns antígenos de superfície, confirmando a sua integridade celular. (Peng et al., 2009) No entanto, também há alguns investigadores que relatam uma mudança na sua morfologia e capacidade proliferativa após criopreservação. (Dave & Tomar, 2018)

Carinci et al. (2008) identificaram uma subpopulação de células estaminais da polpa dentária com potencial osteogénico, que formavam tecido tipo osso *in vivo*, e chamaram a estas células osteoblastos derivados de células estaminais da polpa dentária humana (ODHPSCs). (Huang et al., 2009)

Estes estudos comprovam o potencial de utilização das DPSCs na regeneração tecidual dentária. (Peng et al., 2009)

b) SHEDs

O desenvolvimento dentário é um processo complexo associado com a transição entre dentes decíduos e dentes permanentes, e essa transição envolve uma coordenação entre a reabsorção das raízes dos dentes decíduos e a simultânea erupção dos dentes permanentes. (Dave & Tomar, 2018)

A descoberta de células estaminais presentes nos dentes decíduos foi feita por Miura et al. (2003), que as isolaram numa cultura a baixa densidade, o que resultou em formações de colónias em aproximadamente 12-20 células de cada dente.

As SHEDs têm uma morfologia típica de fibroblasto, com algumas células a possuir uma forma oval ou poligonal. (Dave & Tomar, 2018)

As células possuem uma série de vantagens, em que se incluem o seu elevado rácio de proliferação, quando comparadas com as células estaminais dos dentes permanentes, a sua facilidade de expansão *in vitro*, e a sua plasticidade, pois podem-se diferenciar em neurónio, adipócitos, osteoblastos e odontoblastos. (Peng et al., 2009)

Miura et al. (2003) demonstrou ainda que em comparação com as BMMSCs, e as DPMDs, as SHED revelaram um maior rácio de proliferação e um número maior de duplicação da população. Os autores também comprovaram a formação de tecido mineral pelas células, e a formação de odontoblastos, no entanto foram incapazes de regenerar um complexo tipo dentina-polpa completo, como as DPSCs *in vivo*.

Estes estudos comprovaram assim que as SHEDs são uma fonte ideal de células estaminais para reparação de tecidos dentários e ósseos.

c) PDLSCs

Melcher (1976) propôs que o ligamento periodontal é gerido por uma população celular heterogénea presente no PDL que se consegue diferenciar em fibroblastos, osteoblastos e cementoblastos. (Bassir et al., 2016)

No entanto foi só anos mais tarde que as células estaminais derivadas do ligamento periodontal de dentes humanos saudáveis foram isoladas e caracterizadas pela primeira vez por Seo et al. (2004).

Possuem características clássicas de células estaminais, como tamanho reduzido, ciclo celular lento, e a presença de vários marcadores de expressão de células estaminais, e ainda demonstram um crescimento celular mais rápido e capacidades clonogénicas superiores, quando comparadas com as BMMSCs. (Bossù et al., 2014)

Uma análise comparativa em que analisava as PDLSCs de doadores de diferentes idades, demonstrou que o potencial de proliferação, migração e diferenciação destas células diminui com a idade. (Dave & Tomar, 2018)

Os autores Seo et al. (2004) verificaram que as células apresentavam capacidade de auto-renovação e de multipotência, sendo capazes de se diferenciar em cementoblastos, osteoblastos, adipócitos e células formadoras de colagénio. Para além disso, as células formaram estruturas tipo cimento e tipo PDL após a sua transplantação ectópica para o dorso de ratos imunodeficientes. (Bassir et al., 2016) Esse tecido é formado por colagénio denso tipo I, e uma característica importante foi que as fibras de colagénio *in vivo* foram capazes de se conectar a estruturas de cimento recém-formado, que mimetizavam o posicionamento fisiológico das fibras de Sharpey. (Huang et al., 2009)

Os autores Orciani et al. (2008) demonstraram que a reimplantação local de células expandidas podia representar um método promissor para o tratamento de defeitos periodontais. (Peng et al., 2009)

Foram obtidas PDLSCs do ligamento periodontal inflamado de defeitos intraósseos, durante cirurgias de retalho, e foi verificado que essas células possuem capacidade de proliferação e diferenciação semelhantes, mas melhor capacidade migratória e ainda baixo potencial osteoblástico, quando comparadas com PDLSCs saudáveis. Foi também demonstrado que células estaminais provenientes de tecido periodontal afetado com periodontite se diferenciavam em precursores de células neurais com alta capacidade proliferativa, *in vitro*. (Bossù et al., 2014)

Alguns autores investigaram as diferenças entre as PDLSCs de dentes permanentes e decíduos, e Silvério et al. relatou que as PDLSCs de dentes decíduos possuíam uma maior habilidade de se diferenciarem em células tipo adipócitos, em vez de células tipo osteoblastos, comparando com as PDLSCs de dentes permanentes. (Bossù et al., 2014)

O ligamento periodontal revelou-se uma viável fonte alternativa para possíveis precursores serem usados em terapias de células estaminais. (Peng et al., 2009)

d) SCAPs

As células estaminais derivadas da papila apical foram isoladas e caracterizadas por Sonoyama et al. (2008) de raízes imaturas de terceiros molares impactados humanos.

O termo papila apical refere-se aos tecidos moles nos ápices de dentes permanentes em desenvolvimento, e é entre a papila apical e a polpa que se encontra uma região rica em células. (Sonoyama et al., 2008) A diferença entre a polpa dentária e a papila apical, é que a papila apical é o tecido precursor da polpa radicular. Isto pode querer dizer que as SCAPs são similares às células estaminais residentes na papila dentária que dá origem aos odontoblastos produtores de dentina. (Huang et al., 2009)

As SCAPs demonstram uma alta capacidade de duplicação populacional, de proliferação e de mineralização, quando comparadas com as DPSCs. (Dave & Tomar, 2018)

SCAPs humanas foram transplantadas em ratos imunodeficientes e estas geraram uma estrutura típica de dentina. No mesmo estudo, ambas SCAPs e PDLSCs humanas foram transplantadas para porquinhos-da-índia, tendo gerado um complexo raiz/periodonto que mimetizasse o *setup* raiz/periodonto *in vivo*. (Bossù et al., 2014)

Foi relatada na literatura a capacidade de diferenciação das SCAPs em células osteogénicas, neurogénicas e adipogénicas *in vitro*. (Aydin & Şahin, 2019)

As SCAPs não demonstraram qualquer alteração no seu rácio celular, eficiência de formação de colónias, rácio de proliferação, potencial de diferenciação, marcadores de superfície de MSC e rácio apoptótico, após a sua criopreservação. (Dave & Tomar, 2018)

e) DFSCs

As DFSCs foram isoladas e caracterizadas por Morszeck et al. (2005) de folículos dentários de terceiros molares recém extraídos.

O folículo dentário é um tecido ectomesenquimal derivado da crista neural que limita a papila dentária, encapsula o órgão do esmalte e contém células estaminais mesenquimais progenitoras do periodonto (do cemento, PDL e osso alveolar), do germen dentário em desenvolvimento antecedente à erupção. (Dave & Tomar, 2018; Huang et al., 2009)

Similarmente às outras células estaminais dentárias, estas células formam números pouco elevados de colónias clonogénicas aderentes. (Huang et al., 2009) Demonstram uma forma tipo-fibroblasto típica, e expressam marcadores de superfície de células estaminais. (Bossù et al., 2014)

Sob os estímulos apropriados, estas células podem sofrer diferenciação osteogénica, adipogénica ou condrogénica. E devido ao facto de serem derivadas de um tecido em desenvolvimento, a sua plasticidade é muito melhor do que a maior parte das células estaminais dentárias. (Aydin & Şahin, 2019)

Morszeck et al. (2005) verificou que a transplantação de DFCs pelos mesmos métodos descritos para as outras DTSCs gera uma estrutura composta por tecido fibroso ou rígido, no entanto sem a formação de dentina, cimento ou osso, que pode ter sido explicado pelo baixo número de células em cultura.

O potencial osteogénico das DFSCs não é afetado pela criopreservação das células. (Dave & Tomar, 2018)

Considera-se que as DFSCs são candidatos convenientes para o tratamento de doenças inflamatórias crónicas, por possuírem propriedades imunossupressoras. (Junjun Liu et al., 2015)

f) TGSCs

O gérmen dentário é uma acumulação de células precursoras que geram o dente e os seus tecidos. O gérmen de terceiros molares normalmente começa-se a formar aos 6 anos de idade, altura em que os tecidos remanescentes do período embrionário estão não diferenciados e em desenvolvimento, sendo por esta razão que a capacidade de proliferação das células derivadas deste tecido é extremamente alta. (Aydin & Şahin, 2019)

A diferenciação das TGSCs resulta em células com características funcionais, morfológicas e fenotípicas de hepatócitos. Foi ainda demonstrado que possuem a capacidade de se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteoblastos, odontoblastos, células endoteliais e neuronais. (Dave & Tomar, 2018)

Estas características fazem TGSCs viáveis candidatas para reprogramação somática celular e para terapias celulares. (Dave & Tomar, 2018)

2.6 Aplicações das Células Estaminais Mesenquimais na Medicina Dentária

A reparação e regeneração de tecido maxilofacial ou dentário é um dos principais desafios para os clínicos e engenheiros biomédicos, e o uso de células estaminais dentárias ou ósseas tem sido uma possibilidade cada vez mais estudada (Ansari et al., 2017; Santosh & Bose, 2019). Várias podem ser as razões para a perda de tecido maxilofacial e dentário, como por exemplo doenças orais infecciosas, traumas, tumores ou ressecções de quistos, doenças congénitas ou de desenvolvimento (ex: fenda palatina) e perda de dentes; trazendo estas várias alterações funcionais, estéticas e ainda psicológicas para o indivíduo. (Padial-Molina et al., 2015)

Os tecidos orais e maxilofaciais consistem em tecidos duros e moles, e os seus defeitos podem dividir-se em 3 grandes grupos: defeitos dentários, que se incluem defeitos do tecido duro dentário, doenças pulpares e doenças periodontais; defeitos maxilofaciais e defeitos da mucosa. Figura 6 (Mendi et al., 2019)

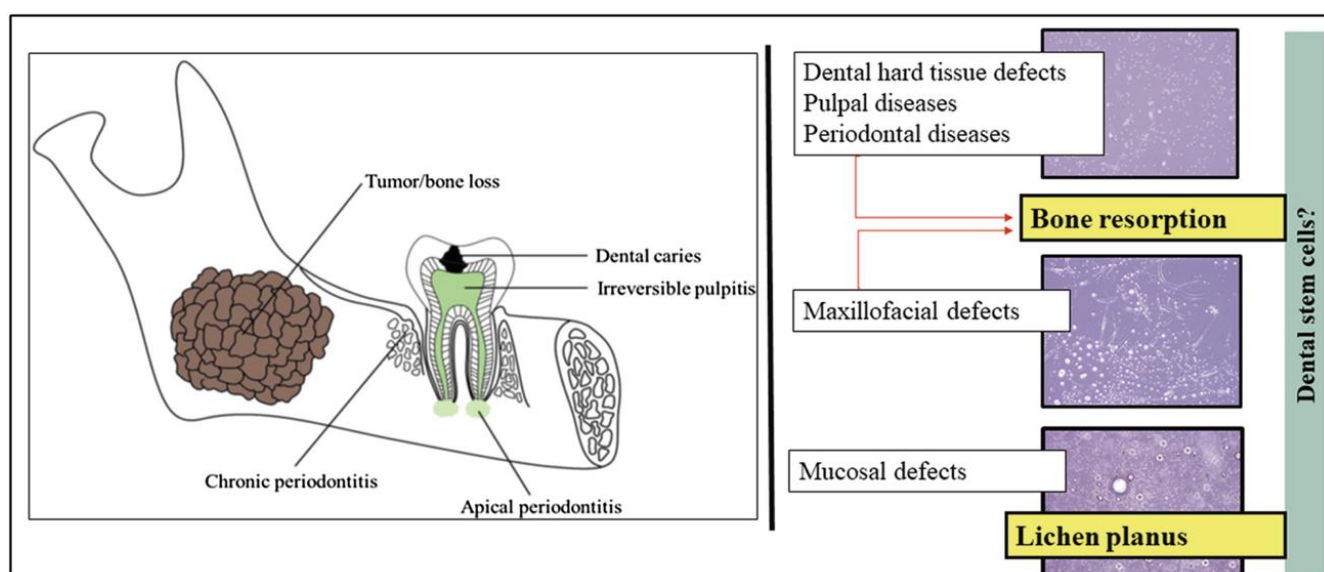


Figura 6: Defeitos dos tecidos orais e maxilofaciais. Adaptado de (Mendi et al., 2019)

Nos próximos pontos serão expostas as aplicações das células estaminais na regeneração dos defeitos dentários (pulpares e periodontais) e ainda na regeneração dos defeitos maxilofaciais.

2.6.1 Regeneração da polpa dentária

O objetivo do tratamento endodôntico é remover a polpa infetada do dente mecanicamente, e substituí-la por um material inerte, para a completa esterilização do canal dentário. No entanto, este tipo de tratamento não é capaz de restaurar o tecido da polpa dentária perdido, nem manter a viabilidade do dente, o que torna o dente mais suscetível a fraturas e infeções secundárias. Para que tal seja evitado, o tratamento passaria por remover a polpa infetada e substituí-la por polpa sã, recorrendo ao uso de DPMSCs. (Sharpe, 2016; Sui et al., 2019)

A inervação e a vascularização da polpa dentária estão intimamente relacionadas com a hemóstase da polpa, e a angiogénese e neurogénese são ambas essenciais para a regeneração pulpar. (Nakashima & Iohara, 2014)

Num estudo de Prescott et al. (2008), as células estaminais da polpa foram isoladas e colocadas juntamente com proteínas da matriz dentinária (DMP1), num *scaffold*, e inseridas no interior de uma fina fatia de dente, que posteriormente foi transplantada subcutaneamente para um rato imunodeficiente. Foi verificado que após 6 semanas um tecido tipo polpa dentária começou a desenvolver-se no interior da fatia. (Nakashima & Iohara, 2011)

Noutro estudo de Nakashima et al. (2017), que envolveu a aplicação de DPMSCs autólogas em dentes de 5 doentes com pulpites irreversíveis, foi concluído que após 24 semanas 3 dos 5 doentes demonstraram regeneração pulpar total e formação de dentina, e 4 dos 5 doentes apresentaram respostas positivas aos testes elétricos pulpares, indicando a viabilidade da polpa regenerada, com recuperação nervosa. (Sharpe, 2016; Sui et al., 2019)

O estudo de Xuan et al. (2018) foi outro estudo que demonstrou evidência na utilização de células estaminais dentárias na regeneração pulpar, mas desta vez com células de dentes decíduos. (Sui et al., 2019) Em 36 dentes de 36 doentes que tinham sofrido traumas dentários, 26 dentes randomizados receberam implantação de SHED autólogas, e os outros 10 foram tratados com apexificação tradicional, servindo de controlo. (Sui et al., 2019; Xuan et al., 2018) Após 12 meses, verificou-se a formação de novo tecido pulpar, com vasos sanguíneos e nervosos, e ainda que a implantação de SHED fez com que o comprimento da raiz aumentasse e que o tamanho do ápex diminuísse, o que indicou que a nova polpa dentária que se regenerou possuía uma

função normal e podia manter o habitual desenvolvimento do dente imaturo. (Sui et al., 2019)

Estes procedimentos envolvem técnicas muito complexas, como extração dentária, extirpação pulpar, colocação das células em cultura, seleção de populações de células estaminais, expansão da cultura celular, armazenamento e transporte, e custos igualmente elevados. Uma alternativa ao transplante de células estaminais, é o *homing* das células estaminais. (Eramo et al., 2018) *Stem cell homing*, em inglês, é o processo pelo qual as células estaminais respondem a gradientes de quimioataxia, migrando através dos gradientes e posicionando-se em áreas específicas. O termo inicialmente foi usado para descrever a migração das células estaminais hematopoéticas após transplante, pelo sangue periférico, para os nichos de células estaminais, localizados na medula óssea. (Ratajczak & Abdelbaset-Ismail, 2016) Em comparação com o transplante de células estaminais, o *homing* de células estaminais parece ser mais fácil de executar clinicamente, visto que não é necessário isolar ou manipular as células estaminais *in vitro*. (Eramo et al., 2018) O conceito de *homing* das células estaminais para regeneração da polpa ou dentina foi pela primeira vez introduzido em 2010. (He et al., 2017)

Sendo assim, nesta técnica usam-se *scaffolds* impregnados com fatores de crescimento, que são injetados no interior de canais radiculares desprovidos de polpa, para assim induzir a migração, proliferação e diferenciação endógena de células estaminais que se encontrem ao redor do ápex radicular, células estas que incluem as DPMSCs, SCAPs e BMMSCs. Para além disso, é necessário que se garanta uma desinfecção canalar ótima, e que o tamanho do ápex radicular seja apropriado, devendo ser o mais pequeno possível, sem, no entanto, afetar a migração celular, a neovascularização e a reinervação. (Eramo et al., 2018)

No estudo de Widbiller et al. (2018) foi criado um modelo animal ectópico para simular o *homing* de células estaminais. As raízes de dentes humanos foram preenchidas com *scaffold* com proteínas da matriz de dentina e foram colocadas células estaminais da polpa dentária na região da ponta de cada raiz. 4 semanas depois da sua implantação subcutânea em ratos imunodeficientes, foi verificada a formação de tecido tipo polpa.

Os relatos na literatura de *homing* de células estaminais *in situ* são escassos, na revisão sistemática de Eramo et al. (2018), foi descrito apenas um estudo *in situ* de *homing* de células estaminais, realizado por Yang et al. (2015). Neste, os autores testaram a técnica em cães da raça Beagle. Nos dentes pré-molares injetaram *scaffolds*

com fatores de crescimento vs coágulo sanguíneo (grupo de controle), e após 3 meses verificaram tecidos canais regenerados, com neovascularização, inervação e formação de dentina. (Eramo et al., 2018)

A técnica de *homing* celular (Figura 7) representa atualmente o caminho mais viável clinicamente para regeneração pulpar, pois incorpora as células estaminais do próprio indivíduo através de sinais biológicos. (He et al., 2017)

No entanto, apesar dos avanços em relação ao estudo da regeneração pulpar via *homing*, esta técnica necessita de aperfeiçoamento e conhecimento, para poder ser aplicada efetivamente no consultório dentário. Um fator contra desta técnica, é que depende das condições biológicas do dente, por isso em dentes com necrose pulpar, por exemplo, pode não ser viável. (Eramo et al., 2018)

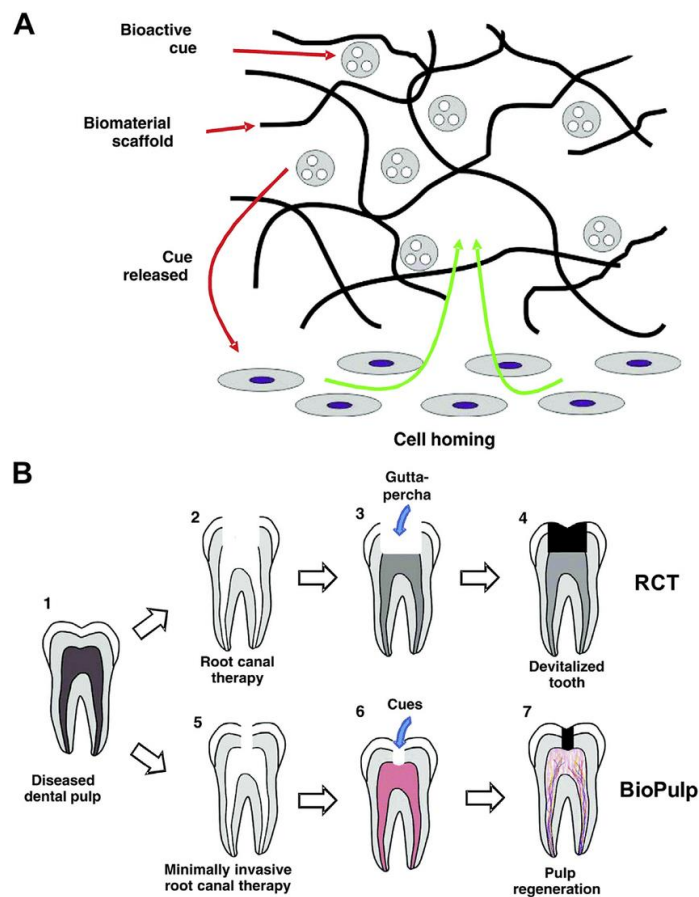


Figura 7: Representação da técnica *homing* celular para regeneração pulpar. (A) Os sinais bioativos incorporados em *scaffolds* libertam-se e atraem as células estaminais vizinhas para essa região. (B1) O dente infetado pode ser tratado por tratamento endodôntico convencional (B2, B3, B4), ou pode sofrer apenas um tratamento canalar minimamente invasivo (B5), e ser depois injetado com fatores biológicos para que aconteça o *homing* celular (B6), resultando num dente vital com a pulpa regenerada (B7). Adaptado de (He et al., 2017)

2.6.2 Regeneração do ligamento periodontal

A doença periodontal é uma das principais causas de perdas de peças dentárias no mundo desenvolvido, tendo a sua prevalência aumentado nos últimos 10 anos, e o controlo da doença e restauração do tecido periodontal perdido é extremamente difícil, devido à complexidade do tecido. (Jin Liu et al., 2019; Sharpe, 2016) O processo osteogénico parece anteceder a diferenciação do cemento e das fibras, e só depois é que as fibras se inserem firmemente no cemento recém-formado e no osso alveolar, procedimento que é extremamente difícil de obter em laboratório. (Jin Liu et al., 2019)

O objetivo do tratamento periodontal é o controlo da infeção e a reconstrução da estrutura e função dos tecidos periodontais, que incluem o cemento, as fibras do ligamento periodontal (PDL) e osso. (Jin Liu et al., 2019)

As células derivadas do ligamento periodontal PDLSCs são as células mais prováveis de dar origem às células do tecido do ligamento e possivelmente aos cementoblastos e osteoblastos. (Sharpe, 2016)

No entanto, já foi provado que ambas as células estaminais intra e extra-orais representam possibilidades viáveis para formar e expandir colónias para serem usadas na engenharia de tecidos periodontais. (Han et al., 2014) O auto-transplante de BMMSCs, comprovou a regeneração de mais de 20% de cemento e osso alveolar num ensaio experimental de defeitos periodontais classe III feito em cães, realizado por Kawaguchi et al. (2004). (Han et al., 2014) Noutro estudo de Tobita et al. (2008), foi provado que ATMSCs misturadas com plasma rico em plaquetas promoveram a regeneração periodontal de estruturas tipo PDL e osso alveolar em ratos (Han et al., 2014)

Os autores Seo et al. (2004) foram os primeiros a transplantar PDLSCs humanas num *scaffold* de hidroxiapatite em defeitos periodontais nos molares mandibulares de ratos imunodeficientes, criados artificialmente. Após 8 semanas verificaram a reconstituição de estruturas tipo cemento e PDL nas zonas recetoras. (Tomokiyo et al., 2019)

Anos mais tarde os autores (Chen et al., 2016) analisaram a aplicação de PDLSCs em defeitos periodontais, e a frequência e extensão de possíveis efeitos adversos. O isolamento e cultura de células foi feita após extração de terceiros molares humanos impactados ou sem função. Entre os dois grupos de estudo, o grupo de controlo recebeu apenas tratamento cirúrgico com Bio-oss e o grupo de tratamento

recebeu Bio-oss com a cultura de células, em ambos aplicados nos defeitos periodontais ósseos. Após 12 meses pós-operatórios comprovou-se que todos os defeitos tinham melhorado, sem que tivesse havido perda de nenhum dente. Através de radiografias periapicais, foi possível confirmar o crescimento do osso alveolar em ambos os grupos, sendo que não houve qualquer diferença estatisticamente relevante entre os dois grupos.

Para além das células do PDL, também outras células dentárias têm sido avaliadas, como no estudo de Aimetti et al. (2018), em que o objetivo foi explorar os possíveis objetivos da aplicação de células estaminais da polpa dentária em defeitos intra-ósseos. Foram selecionados 11 doentes saudáveis não fumadores diagnosticados com periodontite crónica generalizada, e que possuísem pelo menos 1 dente vital passível de extração por razões de mau-posicionamento. As DPMSCs foram recolhidas desses dentes após serem extraídos, e colocadas num *scaffold* de colagénio. De seguida esse produto foi colocado de forma a preencher totalmente os defeitos intraósseos. Durante 1 ano os doentes foram seguidos para medir as progressões do tratamento. Nenhum defeito demonstrou inflamação ou hemorragia à sondagem, sendo que foram confirmadas melhorias clínicas nas regiões tratadas cirurgicamente. Em termos radiográficos, o preenchimento ósseo teve valores entre 3,6 e 1,9mm, e houve uma completa regeneração das bolsas periodontais em 63,6% dos defeitos tratados, enquanto que ainda se verificaram em 36,4% das regiões, profundidades de sondagem de 4 a 5mm

Recentemente foi criada uma nova técnica de engenharia de tecidos que também pode ser aplicada na regeneração periodontal, chamada de *cell transfer technology* em inglês. (Iwasaki et al., 2019) Nesta técnica transferem-se as culturas de células para *scaffolds* através de fotolitografia, que é usada muitas vezes para impressão industrial, cuja vantagem é a formação de padrões específicos para a organização celular pretendida. (Iwasaki et al., 2019)

No estudo de Akazawa et al. (2017) foram utilizados *scaffolds* feitos de membrana amniótica, ou amnio, devido à sua elasticidade, flexibilidade e elevado sucesso de transferência celular. Aplicando esta técnica na regeneração periodontal, existe uma regeneração dos tecidos, incluindo o osso, PDL e cimento. Foram usados ratos com defeitos criados artificialmente, e transferidas as PDLSCs-amnio. Após 4 semanas houve um aumento da regeneração periodontal, em comparação com o grupo de controlo, com regeneração de cimento, PDL e osso, analisados histologicamente.

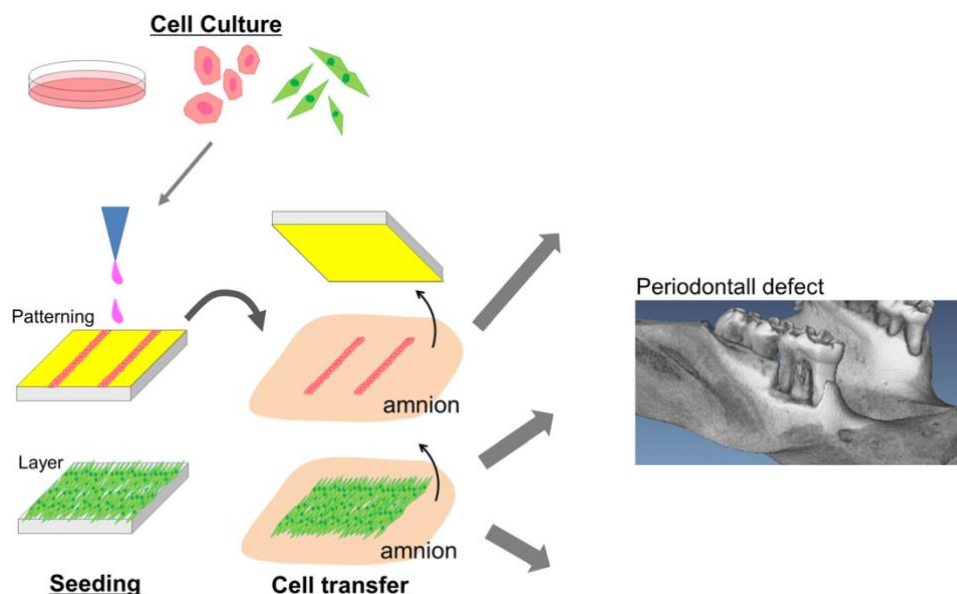


Figura 8: Esquema do transplante celular utilizando a tecnologia de cell transfer. As células são transferidas para a superfície do amnio usando um padrão específico, ou em forma de camadas celulares. Este scaffold pode ser então aplicado em regiões de defeitos periodontais. Adaptado de (Akazawa et al., 2017)

2.6.3 Regeneração dos tecidos maxilofaciais

O processo de reabsorção óssea acontece inevitavelmente sempre que existe uma perda dentária. (Mendi et al., 2019)

As perdas dentárias poderão ser resolvidas através da aplicação de implantes osteointegrados, no entanto, para estes terem sucesso, é necessário uma quantidade e qualidade óssea apropriada. Em casos de falta de osso, quer seja uma perda localizada devido, por exemplo, à doença periodontal, ou uma atrofia generalizada como resultado de síndromes, traumas, ou reabsorções por tumores, o ideal seria conseguir regenerar o osso perdido. (Pranskunas et al., 2019)

As abordagens cirúrgicas que mais se utilizam são o transplante de osso autógeno, recolhido de locais doadores, tanto extraorais como intraorais. No entanto este processo acarreta algumas desvantagens, tais como reabsorção do osso transplantado, dor pós-operatória, risco de infecção e problemas imunológicos, o que trouxe a necessidade de procurar técnicas que regenerem o osso com as mesmas propriedades osteogénicas que o osso autógeno. (Mendi et al., 2019)

A utilização de células estaminais mesenquimais é considerada como possível tratamento, visto que estas são capazes de aumentar o número de células osteogénicas. (Behnia et al., 2012) A aplicação de células estaminais na regeneração dos tecidos maxilofaciais tem sido avaliada para vários casos (figura 9), como anomalias dentofaciais (defeitos alveolares), disfunções da articulação temporomandibular, distração mandibular e expansão maxilar. (Safari et al., 2018)

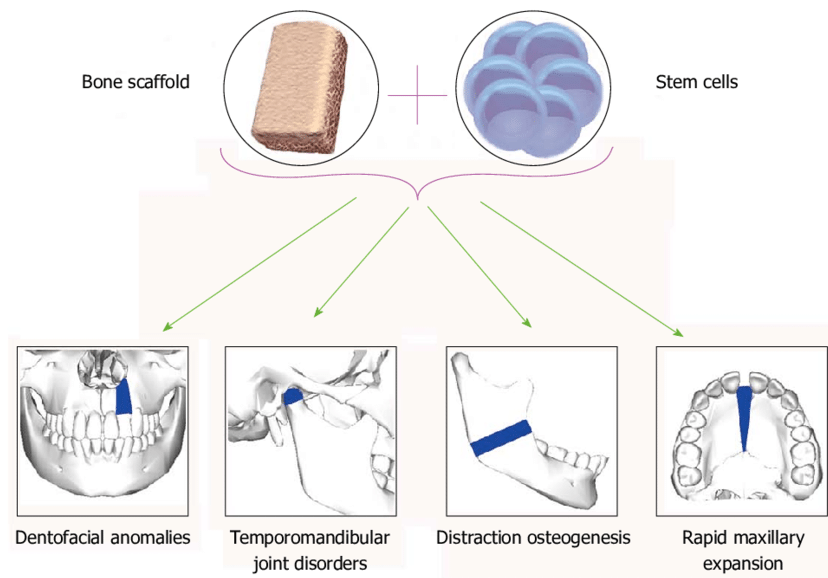


Figura 9: Possíveis aplicações das células estaminais na regeneração de tecidos maxilofaciais. Adaptado de (Safari et al., 2018)

Zheng et al. (2009) recorreram ao porquinho-da-índia para examinar a possibilidade de utilizar células estaminais autógenas para reparar defeitos ósseos mandibulares. Foram obtidos 16 porquinhos-da-índia e recolhidos os tecidos pulpaes de incisivos decíduos. Em 10 porquinhos-da-índia foi criado cirurgicamente um defeito mandibular grande para serem observados a longo prazo, após 24 semanas, e nos outros 6, foram criados 2 defeitos mais pequenos, para serem observados a curto prazo, após 2, 3 e 4 semanas. No primeiro grupo, as TC demonstraram regeneração quase completa dos defeitos, com formação de osso. No segundo grupo, a TC demonstrou formação de osso moderada.

Num estudo de Behnia et al. (2012), foram implantados *scaffolds* com uma estrutura feita de substituto ósseo, MSCs e fatores de crescimento, em defeitos alveolares de 3 pacientes e foram observados 3 meses depois através de tomografia computadorizada. Foi verificada uma recuperação com sucesso, sem fístulas ou comunicações oro-nasais em todo os casos, em que o maior dos defeitos medidos alcançou uma regeneração óssea de 51,3% no pós-operatório. Apesar disso, esta quantidade de osso é mais baixa que a formada através de técnicas de enxertos ósseos. E neste caso, também não existiu nenhum grupo de controlo devido a assuntos éticos, o que diminuiu a validade do caso. (figura 10)

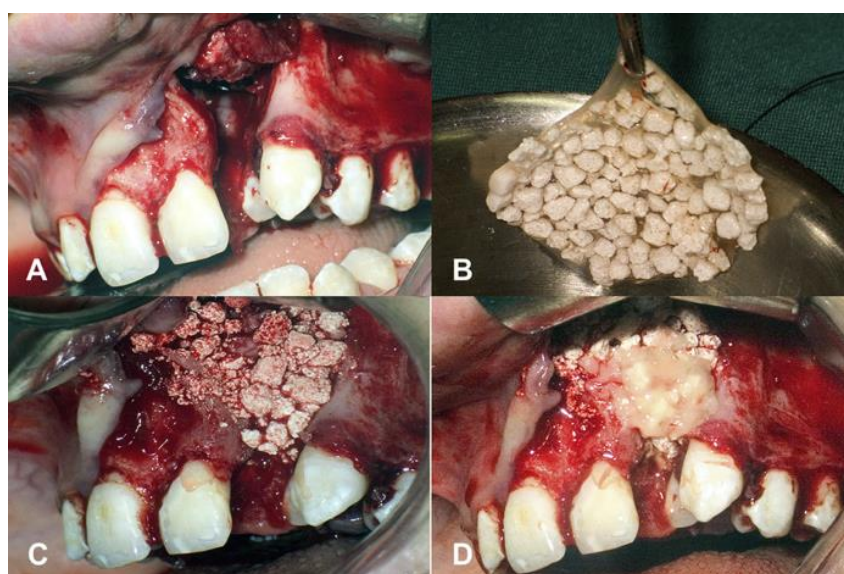


Figura 10: Demonstração da implantação de scaffolds com MSCs e fatores de crescimento num defeito alveolar mandibular. Adaptado de (Behnia et al., 2012)

Os autores Gjerde et al. (2018) realizaram um estudo para avaliar a regeneração óssea em mandíbulas atrofiadas, através do implante de BMMSCs, em que incluíram 11 pacientes com idades entre os 52 e os 79 com reabsorções do rebordo mandibular severas. 4 a 6 meses depois, o osso foi analisado clínica e radiograficamente, tendo sido comprovada nova formação de osso, com volume adequado para instalação de implantes, sem efeitos adversos.

Já o estudo de Jin et al. (2019) teve como objetivo comparar o potencial de regeneração entre DPMSCs e ADMSCs em modelos de defeitos mandibulares em ratos. As DPMSCs foram retiradas de 3º molares humanos entre os 20 e 25 anos, extraídos por razões ortodônticas, e as ATMSCs foram obtidas por lipoaspiração de mulheres

saudáveis entre os 25 e os 35 anos de idade. Depois foram criados cirurgicamente defeitos ósseos mandibulares em 15 ratos, e implantadas DPMSCs em 5 ratos, ATMSCs noutros 5 ratos e os restantes 5 serviram como grupo de controlo. Após 6 semanas os ratos foram eutanasiados para se estudarem os resultados. Tanto as DPMSCs, como as ATMSCs exibiram formação de colónias, no entanto as DPMSCs demonstraram uma maior eficiência de formação de colónias, e um rácio de proliferação mais elevado, o que significa que têm um poder angiogénico maior. No entanto, no que toca a formação de osso propriamente dita, esta foi marcadamente maior no grupo com ATMSCs, indicando uma capacidade osteogénica maior.

Noutro estudo, de Tee & Sun (2020) o objetivo de estudo foi comprovar se as MSCs derivadas da medula óssea transplantadas estimulavam regeneração óssea. Foram utilizados ratos com defeitos criados cirurgicamente, para o transplante de MSCs e porcos para os dadores das células, pois as suas MSCs têm semelhanças com as dos humanos. Após 6 semanas foram feitas tomografias computadorizadas, e foi verificado que ainda permaneciam grandes defeitos ósseos em ambos os grupos tratados e de controlo, com formação mínima de osso. Como foi utilizado enxerto xenogénico, isso pode explicar o resultado: a resposta imunitária pode provocar uma inibição na função osteogénica das MSCs, para além de as diminuir em quantidade.

No caso das disfunções temporomandibulares, não existem ensaios clínicos realizados em humanos, apesar de estarem a ser feitos cada vez mais estudos em animais.

Alhadlaq & Mao (2003) realizaram um estudo com o objetivo de originar um côndilo com formato humano através de BMMCSs de ratos. As células foram recolhidas, foram tratadas com fatores condrogénicos e osteogénicos e depois inseridas em moldes de poliuretano de côndilos humanos. Depois estes modelos foram implantados no dorso dos ratos. 8 semanas depois foram recolhidos os modelos e analisadas as formações celulares. Os resultados histológicos demonstraram a formação de côndilos com tecido opaco, firme e mantinham a forma de um côndilo humano, com a formação de tecido osteogénico e condrogénico.

2.7 Células MUSE

As células MUSE, em inglês *muse cells*, acrónimo para *multilineage-differentiating stress-enduring cells* foram relatadas pela primeira vez por Kuroda et al.

(2010). Estas células expressam marcadores de pluripotência, e são capazes de gerar células representativas das 3 camadas embrionárias a partir de uma única célula, sendo que essa capacidade triploblástica se mantém durante as gerações, sugerindo a sua auto-renovação e pluripotência. (Dezawa, 2016)

O objetivo do estudo de (Kuroda et al., 2010) foi compreender a diferenciação das células estaminais mesenquimais a nível celular único, chegando à conclusão que a pluripotencialidade das células estaminais se devia a uma subpopulação de células, as células MUSE.

Estas células distribuem-se esporadicamente pelo tecido conjuntivo de quase todos os órgãos e não parecem ter qualquer associação com nenhum nicho. No entanto, na medula óssea não residem no tecido conjuntivo, mas sim dentro da cavidade medular. (Dezawa, 2016) Devido à sua heterogeneidade, estas células têm efeito pleiotrópico, no entanto esta característica ainda não está completamente compreendida. Sabe-se apesar de tudo que estas células compreendem apenas 1% da percentagem total de MSCs. (Dezawa, 2016)

Outra característica das células MUSE é o facto de serem não tumorogénicas, sendo a sua velocidade de proliferação de aproximadamente 1,3 dias/divisão celular. Como são células somáticas, proliferam tanto por divisão simétrica como por assimétrica. (Wakao et al., 2018) Tal significa que mesmo que numa cultura sejam purificadas células 100% MUSE, estas vão sempre regenerar células não MUSE, o que vai diminuindo a proporção de células MUSE. (Wakao et al., 2018)

As células MUSE são ainda tolerantes ao stress e têm uma boa capacidade de sentir e reparar danos no DNA. (Wakao et al., 2018)

Devido a estas propriedades, estas células representam uma mudança no paradigma da regeneração tecidular. No estudo de Kuroda et al. (2010) foi provado que quando administradas em via intravenosa, as células MUSE criavam novas células musculo-esqueléticas, num modelo de degeneração muscular em ratos. Foi também demonstrado no seu estudo que estas células possuem a capacidade de renovar o tecido hepático num modelo de hepatite fulminante em ratos. (Simerman et al., 2016)

As MSCs já são atualmente aplicadas em terapias para doentes, com base na sua eficácia em modelos animais, no entanto ainda há algumas características que continuam desconhecidas. E sendo as células MUSE um tipo celular que foi descoberto relativamente recentemente, apesar dos testemunhos na literatura serem reduzidos, já se chegou à conclusão de que as possíveis terapias com a sua aplicação iriam ter resultados

satisfatórios. Porém, para isso é necessário que se continuem a investigar e a realizar estudos pré-clínicos. (Wakao et al., 2018)

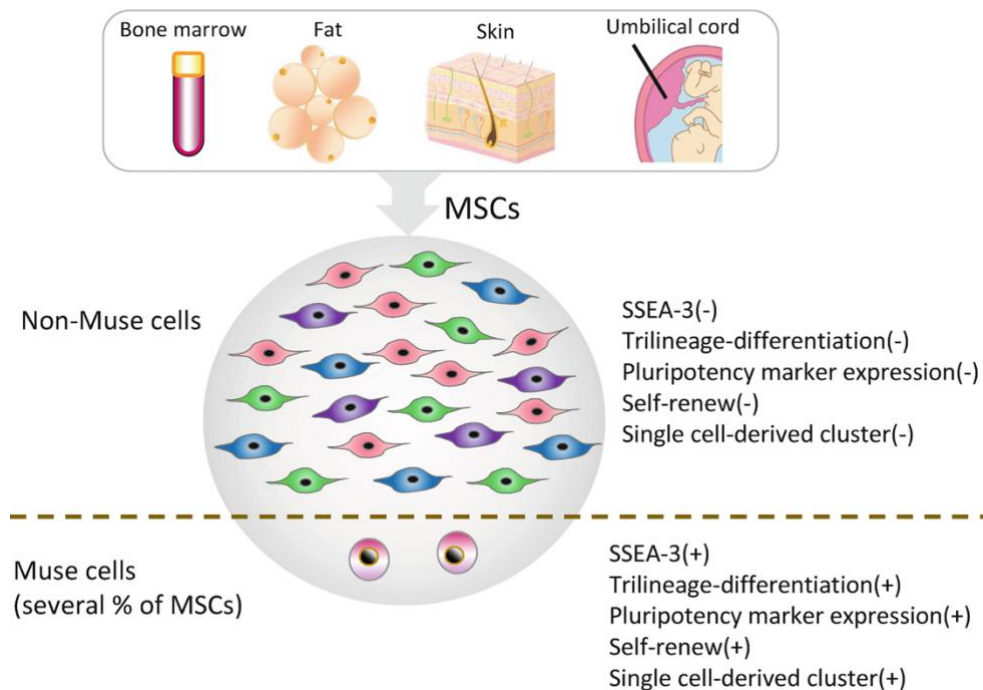


Figura 11: Diagrama esquemático que mostra as diferenças básicas entre as células MUSE e as células não MUSE. Adaptado de (Wakao et al., 2012)

2.8 Banco de células estaminais dentárias

O processo de obtenção, manipulação e armazenamento de células estaminais obtidas de dentes decíduos, de terceiros molares de doentes, em instalações que operem de acordo com as boas práticas de fabrico, recebe o nome de banco de células estaminárias dentárias (figura 12). (Hilkens et al., 2016)

O uso das células estaminais do próprio indivíduo durante o período de tempo de necessidade terapêutica traz uma série de limitações, pois obriga à extração de dentes remanescentes. (Junjun Liu et al., 2015) Além disso a cultura de células estaminais a longo prazo pode vir acompanhada de efeitos deletérios das células, como instabilidade fenotípica, morte células, senescência ou contaminação. (Hilkens et al., 2016)

Por isso a necessidade de recolher e armazenar de forma segura e controlada as células estaminais de dentes decíduos e permanentes a longo prazo, não só mantém as células viáveis, como também assegura a sua estabilidade fenotípica e capacidade de diferenciação. (Hilkens et al., 2016; Junjun Liu et al., 2015)

Atualmente estão a ser testados uma série de protocolos para a criopreservação de DSC, com os seus critérios, para avaliar o possível efeito no comportamento das células. As baixas temperaturas representam um risco para as células, comprometendo o seu metabolismo. Por isso um dos aspetos mais importantes neste processo é a velocidade de arrefecimento celular, pois se for realizado demasiado lento, provoca uma contração e desidratação celular, mas se for realizado demasiado rápido, leva à formação de gelo intracelularmente. (Hilkens et al., 2016)

As células criopreservadas podem durar vários anos, sem que o seu potencial regenerativo seja alterado. (Junjun Liu et al., 2015)

Atualmente a prática de banco de células estaminais dentárias é relativamente pouco comum, apesar de já começar a haver cada vez mais aderência nos países desenvolvidos. (Junjun Liu et al., 2015) Em Portugal apareceu em 2016 o primeiro banco de células estaminais dentárias, que as preserva durante um máximo de 25 anos. Estas são algumas das instituições que o fazem:

- Future Health Bio Bank, Portugal (<https://futurehealthbiobank.com>)
- Criodente, Portugal (<https://criodente.com>)
- BioEDEN, Reino Unido (<https://www.bioeden.com/uk>)
- Teeth Bank, Co, Japão (<http://teethbank.jp>)

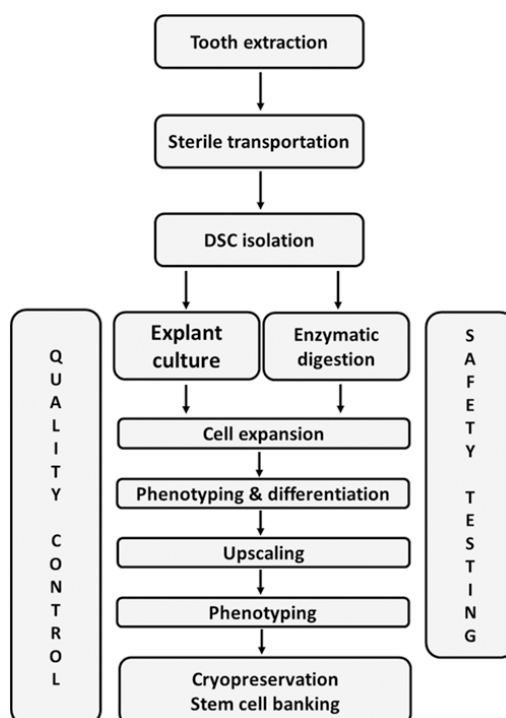


Figura 12: Processo standard esquematizado da criopreservação e manufatura dos produtos baseados em células estaminais dentárias. Adaptado de (Hilkens et al., 2016)

2.9 Futuro na utilização das células estaminais mesenquimais na medicina dentária

Apesar do estudo detalhado das propriedades das células estaminais mesenquimais datar de há mais de 20 anos, o seu potencial clínico apenas foi demonstrado mais recentemente. (Santosh & Bose, 2019) Alguns fatores como a idade do paciente, o tamanho da lesão, a fonte e o número de MSCs têm um grande papel nas abordagens terapêuticas.

O desenvolvimento das descobertas em relação à regeneração de tecidos orais e dentários, acompanhado pelos estudos científicos e experimentais que se têm feitos com células estaminais, irá resultar numa mudança de paradigma no universo da terapia de doenças dentárias e orais, cominando numa intensa pesquisa por “soluções biológicas para problemas biológicos”. (Santosh & Bose, 2019)

O “*scaffold*” ideal que facilite o crescimento, integração e diferenciação das células estaminais ainda está por descobrir. Este deve ser biocompatível, não-tóxico, e ter as características mecânicas e físicas ideais. Apesar de se investigarem métodos de transplantes “*scaffold-free*”, não é o ideal, pois o rácio de sobrevivência celular diminui e há a probabilidade de as células migrarem para diferentes localizações do organismo e possivelmente darem origem a padrões aberrantes de mineralização. (Rodríguez-Lozano et al., 2012)

Os ensaios clínicos dos últimos 10 anos da aplicabilidade das células estaminais mesenquimais no tratamento da periodontite, endodontia, etc, ainda não foram suficientes para a criação de guidelines clínicas definitivas. (Campanella, 2018) Por exemplo o uso de DMSCs para o tratamento pulpar parece à partida um método fascinante, no entanto ainda só está provada a sua validade em dentes permanentes imaturos com necrose pulpar, que representa uma minoria na endodontia. (Campanella, 2018)

Tassi et al. defende que os estudos futuros devam focar-se na definição do fenótipo ideal das MSC *in vitro*, que consigam prever de forma precisa os potenciais regenerativos *in vivo*. (Christian Morsczech & Reichert, 2018)

É da responsabilidade da comunidade científica não gerar falsas esperanças em relação às propriedades e possíveis aplicações das células estaminais. Sendo por isso uma opção viável para os cientistas seguir algumas metodologias clássicas mas que continuam válidas, como o princípio da Lâmina de Ockhams “*pluralitas non est*

ponenda sine neccessitate” que significa “entidades não devem ser multiplicadas sem necessidade” (Dulak et al., 2015)

Devido ao facto de o campo das células estaminais estar repleto de enormes expectativas, deve haver bastante rigor na metodologia. (Dulak et al., 2015) Apesar de ainda não haver nenhum tratamento dentário que envolva o transplante de células estaminais dentárias, estando esta ciência em evolução, pode gerar resultados importantes no futuro. (Campanella, 2018)

III. Conclusão

Esta revisão bibliográfica me fez-me perceber que apesar do tema da utilização de células estaminais mesenquimais estar a ser estudado e desenvolvido já desde os finais dos anos noventa, este assunto ainda tem muito para onde crescer. No que toca à sua utilização na área da medicina em geral, a sua aplicação já se realiza, e com resultados promissores. No entanto, na medicina dentária ainda é um universo muito experimental.

O facto de se realizarem ensaios clínicos *in vitro* com bons resultados são sempre boas notícias, e o primeiro passo para se poder testar em humanos. Foi o que se pode demonstrar pela literatura existente, que os ensaios *in vitro* têm resultados promissores.

Dentro da cavidade oral podem-se obter MSCs de diversas origens, todas elas com potencial de regeneração também de diferentes estruturas. Os ensaios clínicos realizados em animais que conjugam a utilização de MSCs humanas em condições criadas artificialmente são o mais próximo que se tem chegado até agora de ensaios *in vivo* em humanos. Apesar disso, já foram realizados alguns testes em humanos com resultados bastante positivos.

Os locais que, no entanto, continuam a ser os mais utilizados para a recolha de MSCs são a medula óssea e o tecido adiposo, pois são locais com uma grande contagem de células por grama. Assim, os esforços de investigação deviam caminhar para a análise de outros locais de recolha, não só a cavidade oral, como outras estruturas que não acarretem tanta morbilidade, pois a desvantagem da utilização de MSCs provenientes dessas fontes prende-se com esse fator, o que não se justifica numa altura de desenvolvimento científico e tecnológico no seu auge.

Concluo finalmente com a declaração de que a atualização e avanço deste assunto é essencial para o desenvolvimento da área da medicina regenerativa, devido às várias propriedades das MSCs, nomeadamente na sua capacidade de se regenerarem em diferentes tecidos. Para a medicina dentária especificamente essa característica é um fator-chave que resolveria inúmeros problemas e patologias associadas.

Termino com um apelo de esperança para a comunidade científica no sentido de se continuar com a investigação da utilização de MSCs na medicina dentária, para que se possam começar a aplicar na prática clínica.

IV. Bibliografia

- Aimetti, M., Ferrarotti, F., Gamba, M., Giraudi, M., & Romano, F. (2018). Regenerative Treatment of Periodontal Intrabony Defects Using Autologous Dental Pulp Stem Cells: A 1-Year Follow-Up Case Series. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 38(1), 51–58. <https://doi.org/10.11607/prd.3425>
- Akazawa, K., Iwasaki, K., Nagata, M., Yokoyama, N., Ayame, H., Yamaki, K., Tanaka, Y., Honda, I., Morioka, C., Kimura, T., Komaki, M., Kishida, A., Izumi, Y., & Morita, I. (2017). Cell transfer technology for tissue engineering. *Inflammation and Regeneration*, 37(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s41232-017-0052-7>
- Alhadlaq, A., & Mao, J. J. (2003). Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *Journal of Dental Research*, 82(12), 951–956. <https://doi.org/10.1177/154405910308201203>
- Andreasen, J. O., Andreasen, F. M., & Andersson, L. (2007). *Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth* (4th ed.). Blackwell Munksgaard.
- Ansari, S., Seagroves, J. T., Chen, C., Shah, K., Aghaloo, T., Wu, B. M., Bencharit, S., & Moshaverinia, A. (2017). Dental and orofacial mesenchymal stem cells in craniofacial regeneration: The prosthodontist's point of view. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 118(4), 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2016.11.021>
- Argentati, C., Morena, F., Bazzucchi, M., Armentano, I., Emiliani, C., & Martino, S. (2018). Adipose stem cell translational applications: From bench-to-bedside. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113475>
- Aydin, S., & Şahin, F. (2019). Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1144, 123–132. https://doi.org/10.1007/5584_2018_333
- Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., Kasalkova, N. S., Svorcik, V., Kolska, Z., Motarjemi, H., & Molitor, M. (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnology Advances*, 36(4), 1111–1126. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>
- Bassir, S. H., Wisitrasameewong, W., Raanan, J., Ghaffarigarakani, S., Chung, J., Freire, M., Andrada, L. C., & Intini, G. (2016). Potential for Stem Cell-Based Periodontal Therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 50–61.

- <https://doi.org/10.1002/jcp.25067>
- Behnia, H., Khojaste, A., Soleimani, M., Tehranchi, A., & Atashi, A. (2012). Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: A preliminary report. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 40(1), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2011.02.003>
- Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells state-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 18(3), e264–e277. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. In *Cell Stem Cell* (Vol. 2, Issue 4, pp. 313–319). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>
- Bossù, M., Pacifici, A., Carbone, D., Tenore, G., Ierardo, G., Pacifici, L., & Polimeni, A. (2014). Today prospects for tissue engineering therapeutic approach in dentistry. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/151252>
- Bydlowski, S. P., Debes, A. A., Maselli, L. M. F., & Janz, F. L. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31(SUPPL. 1), 25–35. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000038>
- Campanella, V. (2018). Dental Stem Cells: Current research and future applications. *European Journal Of Paediatric Dentistry*, 19(4). <https://doi.org/10.23804/ejpd.2018.19.04.01>
- Carvalho, A. S. (2010). Boa ética e boa ciência: o percurso da investigação em células estaminais. *Revista Interdisciplinar Sobre o Desenvolvimento Humano*, 1, 45–51.
- Chen, F. M., Gao, L. N., Tian, B. M., Zhang, X. Y., Zhang, Y. J., Dong, G. Y., Lu, H., Chu, Q., Xu, J., Yu, Y., Wu, R. X., Yin, Y., Shi, S., & Jin, Y. (2016). Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: A randomized clinical trial. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0288-1>
- Dave, J. R., & Tomar, G. B. (2018). Dental tissue-derived mesenchymal stem cells: Applications in tissue engineering. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 46(5), 429–468. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.2018027342>
- Dezawa, M. (2016). Muse cells provide the pluripotency of mesenchymal stem cells: Direct contribution of muse cells to tissue regeneration. *Cell Transplantation*,

- 25(5), 849–861. <https://doi.org/10.3727/096368916X690881>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Józkowicz, A. (2015). Adult stem cells: Hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), 329–337. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023
- Eramo, S., Natali, A., Pinna, R., & Milia, E. (2018). Dental pulp regeneration via cell homing. *International Endodontic Journal*, 51(4), 405–419. <https://doi.org/10.1111/iej.12868>
- Ferretti, E., & Hadjantonakis, A. K. (2019). Mesoderm specification and diversification: from single cells to emergent tissues. *Current Opinion in Cell Biology*, 61, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.012>
- Giacoppo, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2017). The transplantation of mesenchymal stem cells derived from unconventional sources: an innovative approach to multiple sclerosis therapy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(5), 363–379. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0460-z>
- Giai Via, A., Frizziero, A., & Oliva, F. (2012). Biological properties of mesenchymal stem cells from different sources. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 2(3), 154–162.
- Gjerde, C., Mustafa, K., Hellem, S., Rojewski, M., Gjengedal, H., Yassin, M. A., Feng, X., Skaale, S., Berge, T., Rosen, A., Shi, X. Q., Ahmed, A. B., Gjertsen, B. T., Schrezenmeier, H., & Layrolle, P. (2018). Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0951-9>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Han, J., Menicanin, D., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2014). Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, 59(SUPPL. 1), 117–130. <https://doi.org/10.1111/adj.12100>

- He, L., Zhong, J., Gong, Q., Cheng, B., Kim, S. G., Ling, J., & Mao, J. J. (2017). Regenerative Endodontics by Cell Homing. *Dental Clinics of North America*, 61(1), 143–159. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.08.010>
- Hilkens, P., Driesen, R. B., Wolfs, E., Gervois, P., Vangansewinkel, T., Ratajczak, J., Dillen, Y., Bronckaers, A., & Lambrechts, I. (2016). Cryopreservation and Banking of Dental Stem Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 951, 199–235. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_17
- Huang, G. T. J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Critical reviews in oral biology & medicine: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in Regenerative Medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792–806. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>
- Iwasaki, K., Akazawa, K., Nagata, M., Komaki, M., Honda, I., Morioka, C., Yokoyama, N., Ayame, H., Yamaki, K., Tanaka, Y., Kimura, T., Kishida, A., Watabe, T., & Morita, I. (2019). The fate of transplanted periodontal ligament stem cells in surgically created periodontal defects in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010192>
- Jin, Q., Yuan, K., Lin, W., Niu, C., Ma, R., & Huang, Z. (2019). Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 1577–1584. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1594861>
- Krebsbach, P. H., & Robey, P. G. (2002). Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Therapeutics for Craniofacial Regeneration. *Journal of Dental Education*, 66(6), 766–773. <https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2002.66.6.tb03557.x>
- Kurodaa, Y., Kitadaa, M., Wakao, S., Nishikawa, K., Tanimura, Y., Makinoshima, H., Goda, M., Akashi, H., Inutsuka, A., Niwa, A., Shigemoto, T., Nabeshima, Y., Nakahata, T., Nabeshima, Y., Fujiyoshi, Y., & Dezawa, M. (2010). Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8639–8643. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408053111>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Liu, Jin, Ruan, J., Weir, M. D., Ren, K., Schneider, A., Wang, P., Oates, T. W., Chang, X., & Xu, H. H. K. (2019). Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffolds and Stem Cells. *Cells*, 8(6), 537.

- <https://doi.org/10.3390/cells8060537>
- Liu, Junjun, Yu, F., Sun, Y., Jiang, B., Zhang, W., Yang, J., Xu, G.-T., Liang, A., & Liu, S. (2015). Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*, 33, 627–638. <https://doi.org/10.1002/stem.1909>
- Marcus, A. J., & Woodbury, D. (2008). Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard: Stem Cells Review Series. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(3), 730–742. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00221.x>
- Mendi, A., Ulutürk, H., Ataç, M. S., & Yılmaz, D. (2019). Stem Cells for the Oromaxillofacial Area: Could they be a promising source for regeneration in dentistry? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1144, 101–121. https://doi.org/10.1007/5584_2018_327
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5807–5812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>
- Mora, C., Serzanti, M., Consiglio, A., Memo, M., & Dell’Era, P. (2017). Clinical potentials of human pluripotent stem cells. *Cell Biology and Toxicology*, 33(4), 351–360. <https://doi.org/10.1007/s10565-017-9384-y>
- Morsczeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., Sippel, C., & Hoffmann, K. H. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*, 24(2), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.12.004>
- Morsczeck, Christian, & Reichert, T. E. (2018). Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 18(2), 187–196. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1402004>
- Nakashima, M., & Iohara, K. (2011). Regeneration of dental pulp by stem cells. *Advances in Dental Research*, 23(3), 313–319. <https://doi.org/10.1177/0022034511405323>
- Nakashima, M., & Iohara, K. (2014). Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: Initiation of clinical trial. *Journal of Endodontics*, 40(4S), S26–S32. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.020>
- Nakashima, M., Iohara, K., Murakami, M., Nakamura, H., Sato, Y., Arijji, Y., & Matsushita, K. (2017). Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem

- cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0506-5>
- Padial-Molina, M., O'Valle, F., Lanis, A., Mesa, F., Dohan Ehrenfest, D. M., Wang, H. L., & Galindo-Moreno, P. (2015). Clinical application of mesenchymal stem cells and novel supportive therapies for oral bone regeneration. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/341327>
- Papayannopoulou, T., & Scadden, D. T. (2008). Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood*, 111(8), 3923–3930. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-078147>
- Peng, L., Ye, L., & Zhou, X. (2009). Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *International Journal of Oral Science*, 1(1), 6–12. <https://doi.org/10.4248/ijos.08032>
- Pranskunas, M., Galindo-Moreno, P., & Padial-Molina, M. (2019). Extraction Socket Preservation Using Growth Factors and Stem Cells: a Systematic Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 10(3). <https://doi.org/10.5037/jomr.2019.10307>
- Ratajczak, M. Z., & Abdelbaset-Ismail, A. (2016). Stem Cell Homing. In *In Situ Tissue Regeneration: Host Cell Recruitment and Biomaterial Design* (pp. 21–34). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802225-2.00002-7>
- Rendra, E., Scaccia, E., & Biebac, K. (2020). Recent advances in understanding mesenchymal stromal cells (version1; peer review: 3 approved). *F1000Research*, 9(156). <https://doi.org/10.12688/f1000research.21862.1>
- Rodríguez-Lozano, F. J., Insausti, C. L., Iniesta, F., Blanquer, M., Ramírez, M. del C., Meseguer, L., Meseguer-Henarejos, A. B., Marín, N., Martínez, S., & Moraleda, J. M. (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 17(6), 1062–1067. <https://doi.org/10.4317/medoral.17925>
- Safari, S., Mahdian, A., & Motamedian, S. R. (2018). Applications of stem cells in orthodontics and dentofacial orthopedics: Current trends and future perspectives. *World Journal of Stem Cells*, 10(6), 66–77. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i6.66>
- Samsonraj, R. M., Raghunath, M., Nurcombe, V., Hui, J. H., van Wijnen, A. J., & Cool, S. M. (2017). Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(12), 2173–2185. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0129>
- Santosh, H., & Bose, A. (2019). Stem cells: Redefining the future of dentistry.

- International Journal of Oral Health Sciences*, 9(2), 58–63.
<https://doi.org/10.4103/ijohs.ijohs>
- Scadden, D. T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441(7097), 1075–1079. <https://doi.org/10.1038/nature04957>
- Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y., & Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
- Sharpe, P. T. (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Development*, 143(13), 2273 LP – 2280. <https://doi.org/10.1242/dev.134189>
- Simerman, A. A., Phan, J. D., Dumesic, D. A., & Chazenbalk, G. D. (2016). Muse cells: Nontumorigenic pluripotent stem cells present in adult tissues - A paradigm shift in tissue regeneration and evolution. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1463258>
- Smith, A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(7097), 1060. <https://doi.org/10.1038/nature04954>
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T. J. (2008). Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *Journal of Endodontics*, 34(2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
- Sui, B., Chen, C., Kou, X., Li, B., Xuan, K., Shi, S., & Jin, Y. (2019). Pulp Stem Cell-Mediated Functional Pulp Regeneration. *Journal of Dental Research*, 98(1), 27–35. <https://doi.org/10.1177/0022034518808754>
- Tee, B. C., & Sun, Z. (2020). Xenogeneic mesenchymal stem cell transplantation for mandibular defect regeneration. *Xenotransplantation*, March, 1–11. <https://doi.org/10.1111/xen.12625>
- Tomokiyo, A., Wada, N., & Maeda, H. (2019). Periodontal Ligament Stem Cells: Regenerative Potency in Periodontium. *Stem Cells and Development*, 28(15), 974–985. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0031>
- Trohatou, O., & Roubelakis, M. G. (2017). Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future. *Cellular Reprogramming*, 19(4), 217–224. <https://doi.org/10.1089/cell.2016.0062>
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 726–736.

<https://doi.org/10.1038/nri2395>

- Wakao, S., Kuroda, Y., Ogura, F., Shigemoto, T., & Dezawa, M. (2012). Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells: Contribution of Muse Cells, a Novel Pluripotent Stem Cell Type that Resides in Mesenchymal Cells. *Cells*, 1(4), 1045–1060. <https://doi.org/10.3390/cells1041045>
- Wakao, S., Kushida, Y., & Dezawa, M. (2018). Basic characteristics of muse cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1103, 13–41. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56847-6_2
- Weissman, I. L. (2000). Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100(1), 157–168. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81692-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X)
- Widbiller, M., Driesen, R. B., Eidt, A., Lambrichts, I., Hiller, K. A., Buchalla, W., Schmalz, G., & Galler, K. M. (2018). Cell Homing for Pulp Tissue Engineering with Endogenous Dentin Matrix Proteins. *Journal of Endodontics*, 44(6), 956-962.e2. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.02.011>
- Xuan, K., Li, B., Guo, H., Sun, W., Kou, X., He, X., Zhang, Y., Sun, J., Liu, A., Liao, L., Liu, S., Liu, W., Hu, C., Shi, S., & Jin, Y. (2018). Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Science Translational Medicine*, 10(455). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3227>
- Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, C. M., Zhang, H. Y., Li, W. H., Shi, S., Le, A. D., & Wang, S. L. (2009). Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. *Journal of Dental Research*, 88(3), 249–254. <https://doi.org/10.1177/0022034509333804>

Anexos

Dear Ines,
sure no problem.
Thanks for considering these data.
Best Regards and Good Luck for a brilliant future.

Massimo

Massimo Dominici, MD

Full Professor, Medical Oncology

Director,
Medical Oncology
Residency School of Medical Oncology
Program in Cellular Therapy and Immuno-oncology
Laboratory of Cellular Therapy
University Hospital of Modena and Reggio Emilia
Modena, Italy
massimo.dominici@unimore.it

Dear Inês,

Of course, you can use the table in my review on stem cells for your thesis!

Good luck,

Lucie Bacakova

Lucie Bacakova, MD, PhD, Assoc. Prof.
Head of the Dept. of Biomaterials and Tissue Engineering
Institute of Physiology
Academy of Sciences of the Czech Republic
Videnska 1083
CZ-14220 Prague 4 - Krc
Czech Republic

Dear Inês,

Thank you for your email.

Permission is granted for you to use the material requested for your thesis/dissertation subject to the usual acknowledgements (author, title of material, title of book/journal, ourselves as publisher) and on the understanding that you will reapply for permission if you wish to distribute or publish your thesis/dissertation commercially.

You should also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Material. Permission is granted solely for use in conjunction with the thesis, and the material may not be posted online separately.

Any third-party material is expressly excluded from this permission. If any material appears within the article with credit to another source, authorisation from that source must be obtained.

Should you require any further information, please do not hesitate to contact me.

Kind regards,

Paisley Chesters
Permissions Co-Ordinator

Wiley
The Atrium
Southern Gate
Chichester
West Sussex
PO19 8SQ
www.wiley.com



THESIS COPYRIGHT PERMISSION FORM

Title(s) of the Image(s): Terese Winslow LLC owns the copyright to the following image(s):

“Bone Marrow Aspiration and Biopsy”

Description of the Work: Terese Winslow LLC hereby grants permission to reproduce the above image(s) for use in the work specified:

Thesis title: Mesenchymal Stem Cells: Potential Use in Dentistry

University: Instituto Universitário Egas Moniz

License Granted: Terese Winslow LLC hereby grants limited, non-exclusive worldwide print and electronic rights only for use in the Work specified. Terese Winslow LLC grants such rights “AS IS” without representation or warranty of any kind and shall have no liability in connection with such license.

Restrictions: Reproduction for use in any other work, derivative works, or by any third party by manual or electronic methods is prohibited. Ownership of original artwork, copyright, and all rights not specifically transferred herein remain the exclusive property of Terese Winslow LLC. Additional license(s) are required for ancillary usage(s).

Credit must be placed adjacent to the image(s) in the following format:

For the National Cancer Institute © 2007 Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights

Permission granted to:

Name: Inês Rocha Antunes

Mailing address: Avenida do Pacífico, n.º4, Torre São Gabriel, ap. 307, 1990-291 Lisboa

Email address: inesrantunes@gmail.com

Phone number: 00351935970602

Signature _____

Inês Rocha Antunes
Inês Rocha Antunes

Date 23/07/2020

Signature _____

Terese Winslow
Terese Winslow, CMI, Member

Digitally signed by TERESE WINSLOW
Date: 2020.07.23 14:32:49 -04'00'

Date

Terese Winslow LLC, Medical Illustration

714 South Fairfax Street, Alexandria, Virginia 22314

(703) 836-9121

terese@teresewinslow.com

www.teresewinslow.com

Hi Ines. Sure you can use the table, just please reference it accordingly.

Thank you.

Dr. Roberto Berebichez Fridman

Dear Ines Antunes,
Of course you can use the figure with the reference..
Good luck !

Saygı ve sevgilerimle / With my kind regards

Öğr.Gör.Dr. Ayşegül H. Mendi

Gazi Üniversitesi/Gazi University

Diş Hekimliği Fakültesi /Faculty of Dentistry

Temel Bilimler Bölümü/Department of Basic Sciences

Ankara, Türkiye